



Ricardo Carlos Morgado Soares **Caraterização de bactérias isoladas dos nódulos de *Lotus* spp.**



Ricardo Carlos Morgado Soares **Caraterização de bactérias isoladas dos nódulos de *Lotus* spp.**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Isabel Videira e Castro, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P e da Professora Doutora Etelvina Maria de Almeida Paula Figueira, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Parte deste trabalho foi realizado na *Estación Experimental del Zaidín* - CSIC, Granada, Espanha, com apoio financeiro de uma bolsa do Programa Erasmus no âmbito do projeto **2012-1-PT1-ERA02-12581** da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Professora Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso
Professora auxiliar com Agregação da Universidade de Aveiro

vogal - arguente principal

Doutora Maria Paula Abranches Alvarinhas Fareleira
Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P

vogal - orientador

Doutora Isabel Maria Videira e Castro Viana
Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P

agradecimentos

Quero agradecer a todos os que me ajudaram, quer diretamente, quer indiretamente, na realização desta tese de mestrado. Assim, agradeço profundamente:

À minha família, nomeadamente aos meus pais, por todo o apoio incondicional e pela oportunidade que me deram, pois sem eles nada disto estaria a acontecer neste momento.

À minha orientadora externa, Dra. Isabel Videira e Castro, pela incansável orientação, ajuda e formação ao longo destes anos.

À minha orientadora interna, Dra. Etelvina Figueira, por, desde cedo, me ter orientado no percurso até hoje alcançado.

Ao Dr. Juan Sanjuán e à Dra. Maria José Lorite da *Estación Experimental del Zaidín* (EEZ) por me terem recebido e integrado de forma excecional no seu laboratório e por terem proporcionado a caracterização molecular dos isolados estudados aqui, assim como o conhecimento nesta área.

Ao Dr. Jorge Capelo do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P (INIAV), pela identificação das plantas silvestres de *Lotus parviflorus*.

À Dra. Helena Machado do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P, pelas estirpes de *Phytophthora* e *Botryosphaeria* fornecidas.

A todos os meus amigos pelo apoio durante esta tese. Dos quais, terei que destacar o Pedro Aires, do departamento de Biologia da Universidade de Aveiro (UA), pela, embora infrutífera, tentativa de identificação de plantas silvestres de *Lotus parviflorus* em Estarreja, Aveiro. Destaco também o Paulo Cardoso do departamento de Biologia da UA, pela ajuda nas atividades PGPR, e a Carmen Santos do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P, pela preciosa ajuda no desenho de *primers*.

A todos os elementos do(s) laboratório(s) de Microbiologia do INIAV e do departamento de *Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos* da EEZ, onde se prima pela boa disposição e pela entreaajuda, pelo apoio e pelas diversas ajudas ocasionais.

palavras-chave

Simbiose, rizóbio, filogenia, fixação de azoto, *PGPR*, *Bradyrhizobium*, *Lotus parviflorus*, *Lotus uliginosus*.

resumo

O género *Lotus* engloba espécies com interesse agrícola, como é o caso de *L. uliginosus*, que possui capacidade de se adaptar a condições adversas e é utilizada em pastagens melhoradas. Este género compreende também espécies silvestres, muito pouco estudadas ao nível dos respetivos microssimbiontes, como é o caso de *Lotus parviflorus*. Neste estudo, fez-se a caracterização fenotípica e molecular de estirpes de bactérias isoladas dos nódulos radiculares de *Lotus parviflorus* e de *Lotus uliginosus*.

Os isolados de *L. parviflorus* mostraram-se bastante heterógenos em relação à velocidade de crescimento, absorção de vermelho de congo e diversidade. Apenas um (isolado Lp11), de crescimento lento, revelou a capacidade para nodular espécies de *Lotus*. Taxonomicamente foi incluído na espécie *Bradyrhizobium canariense*, e obteve maior homologia nos genes simbióticos, com isolados de leguminosas da tribo *Genisteae*. Os restantes isolados não revelaram capacidade para nodular espécies de *Lotus*, e, taxonomicamente, muitos destes isolados não pertencem à família *Rhizobiaceae*.

Para além da fixação de azoto, alguns isolados de *L. parviflorus*, revelaram a capacidade de produzir sideróforos (Lp6), de hidrolisar polissacáridos da parede celular das plantas e de inibir o crescimento de fitopatogénios como *Phytophthora cinnamomi* e *Botryosphaeria corticola* (Lp7a e Lp7b).

Nos isolados de *L. uliginosus* estudados, apenas um (Lu13) foi incapaz de nodular plantas de *Lotus* spp., tendo sido classificado fora da família das *Rhizobiaceae*. Foi também o único de crescimento rápido e com absorção intensa do corante vermelho do congo. Os restantes isolados nodularam de forma eficaz *L. uliginosus* e *L. parviflorus*. Nodularam também, mas ineficazmente, *L. tenuis* e *L. corniculatus*. Os isolados com capacidade simbiótica foram identificados como pertencentes ao género *Bradyrhizobium*, com maior similaridade com as estirpes de *Bradyrhizobium* sp. isoladas de *L. uliginosus* de estudos anteriores e com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*. Possuíram maior homologia nos genes simbióticos, com estirpes isoladas de *L. uliginosus*, em estudos anteriores, e também, mas com menor similaridade, com estirpes isoladas dos nódulos de plantas da tribo *Genisteae*.

keywords

Symbioses, rhizobia, phylogeny, nitrogen fixation, PGPR, *Bradyrhizobium*, *Lotus parviflorus*, *Lotus uliginosus*.

abstract

Lotus spp. comprises species with a high agronomic value, like *L. uliginosus*, that can tolerate adverse conditions. It also includes wild species that have been little explored in terms of their microsymbionts. In this study a phenotypic and molecular characterization of bacteria isolated from the root nodules of *Lotus parviflorus* and from *Lotus uliginosus* was performed.

L. parviflorus isolates were very heterogenous regarding the growing type, congo red absorption and genetic diversity. Only the isolate Lp11 was able to induce nodules on *Lotus* plants. This isolate is a slow grower and was classified as belonging to the *Bradyrhizobium canariense* specie. On the basis of the symbiotic genes it was close related with strains isolated from plants of the *Genisteeae* tribe. The remaining isolates didn't nodulate *Lotus* plants, and a lot of them don't belong to the *Rhizobiaceae* family.

Besides nitrogen fixation, some strains isolated from *L. parviflorus*, could produce siderophores (Lp6), hydrolyze cellulose and inhibit the growth of fitopathogens like *Phytophthora cinnamomi* and *Botryosphaeria corticola* (Lp7a and Lp7b).

In the isolates of *L. uliginosus* studied, only one isolate (Lu13) couldn't nodulate *Lotus* plants and was classified outside of the *Rhizobiaceae* family. It was the only one that strongly absorbed congo red and revealed a fast growing type. The remaining isolates of the root nodules of *L. uliginosus* could effectively nodulate *L. uliginosus* and *L. parviflorus* plants. These isolates also nodulated *L. corniculatus* and *L. tenuis*, however, they were ineffective. These isolates belong to the *Bradyrhizobium* genus, with high similarities with *Bradyrhizobium* sp. strains isolated from *L. uliginosus*, in previous studies, and also with some strains of *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*. The symbiotic genes were identical to the isolates of *L. uliginosus* from previous studies, and to a lower degree to some isolates from plants of the *Genisteeae* tribe.

Índice geral

	Página
Índice geral	i
Índice das figuras	iii
Índice das tabelas	v
Glossário	vi
1. Introdução	1
1.1 Fixação biológica do azoto	1
1.1.1 Taxonomia do rizóbio	1
1.1.2 Organogénese do nódulo	2
1.1.3 Genes da nodulação	5
1.1.4 Género <i>Lotus</i>	6
1.2 Outras atividades promotoras de crescimento vegetal	7
1.3 Objetivos	8
2. Materiais	10
2.1 Material biológico	10
2.2 Meios de cultura	11
2.3 Soluções	13
2.4 Tampões	14
2.5 Agaroses	14
2.6 Marcadores de pesos moleculares	15
2.7 Corantes para ácidos nucleicos	15
2.8 Termocicladores	15
3. Métodos	16
3.1 Crescimento e armazenamento dos isolados	16
3.2 Ensaio de nodulação	16
3.2.1 Esterilização das sementes	17
3.2.2 Germinação das sementes	17
3.2.3 Inoculação	17
3.2.4 Avaliação da eficiência simbiótica	17
3.3 Caracterização molecular dos isolados	18
3.3.1 Extração de DNA genómico	18
3.3.2 PCR	20
3.3.3 Amplificação de sequências repetidas	21
3.3.3.1 ERIC- PCR	21
3.3.3.2 REP-PCR	22
3.3.4 Amplificação de genes	23
3.3.4.1 16S rRNA	24
3.3.4.2 Amplificação de genes <i>housekeeping</i>	25
3.3.4.2.1 <i>recA</i>	25
3.3.4.2.2 <i>atpD</i>	26
3.3.4.2.3 <i>glnII</i>	28
3.3.4.3 Amplificação de genes simbióticos	29
3.3.4.3.1 <i>nodC</i>	29
3.3.4.3.2 <i>nifH</i>	30

3.4 Extração de fragmentos de DNA da agarose	31
3.5 Sequenciação de fragmentos de DNA e construção de árvores filogenéticas	31
3.6 Ensaios de inoculação mista	32
3.6.1 Esterilização dos nódulos	34
3.6.2 Isolamento e caracterização das bactérias	34
3.7 Outras atividades promotoras do crescimento vegetal	35
3.7.1 Solubilização de fosfato inorgânico	35
3.7.2 Quelatação de ferro extracelular	35
3.7.3 Hidrólise da celulose e pectina	35
3.7.4 Antagonismo a agentes fitopatogénicos	36
4. Resultados e discussão	37
4.1 Coleção bacteriana isolada e características do crescimento	37
4.2 Ensaios de nodulação	39
4.3 Caracterização molecular	48
4.3.1 Extração de DNA genómico	48
4.3.2 Diversidade bacteriana	49
4.3.2.1 ERIC-PCR	50
4.3.2.2 REP-PCR	51
4.4 Filogenia	52
4.4.1 Gene 16S rRNA	52
4.4.2 Genes <i>housekeeping</i> : <i>recA</i> , <i>atpD</i> e <i>glnII</i>	56
4.4.3 Genes simbióticos: <i>nodC</i> e <i>nifH</i>	64
4.5 Ensaios de inoculação mista	67
4.5.1 Fenótipo de nodulação e caracterização em meio diferencial	67
4.5.2 Amplificação de ERIC-PCR	68
4.5.3 Amplificação e sequenciação do gene <i>recA</i>	69
4.6 Outras atividades promotoras de crescimento vegetal	71
4.6.1 Solubilização de fosfato inorgânico	71
4.6.2 Quelatação de ferro extracelular	72
4.6.3 Hidrólise da celulose e pectina	73
4.6.4 Antagonismo a agentes fitopatogénicos	74
5. Discussão geral	76
6. Conclusão	80
7. Bibliografia	82
8. Anexos	92
Anexo I	92
Anexo II	93
Anexo III	95
Anexo IV	96

Índice das figuras

	Página
Figura 1: Estrutura geral dos Fatores <i>nod</i> .	3
Figura 2: Processo de nodulação Rizóbio-Leguminosa.	3
Figura 3: Diferenciação em bacteróide.	4
Figura 4: Localização da zona de amostragem.	10
Figura 5: Nódulos formados pelo isolado Lp11 nas várias espécies de plantas hospedeiras de <i>Lotus</i> .	40
Figura 6: Tumor formado pelo isolado Lp13b.	42
Figura 7: Zonas da raiz com necrose de tecidos provocadas pelo isolado Lp5a.	42
Figura 8: Nódulos formados por alguns dos isolados de <i>L. uliginosus</i> nas várias plantas de <i>Lotus</i> hospedeiras.	43
Figura 9: Média dos pesos secos dos isolados de <i>L. parviflorus</i> e de <i>L. uliginosus</i> , e respetivos controlos em <i>L. parviflorus</i> (planta hospedeira).	44
Figura 10: Média dos pesos secos dos isolados de <i>L. parviflorus</i> e de <i>L. uliginosus</i> , e controlos em <i>L. uliginosus</i> (planta hospedeira).	45
Figura 11: Média dos pesos secos dos respetivos isolados de <i>L. parviflorus</i> e de <i>L. uliginosus</i> , e respetivos controlos em <i>L. corniculatus</i> (planta hospedeira).	46
Figura 12: Média dos pesos secos dos respetivos isolados de <i>L. parviflorus</i> e de <i>L. uliginosus</i> , e respetivos controlos em <i>L. tenuis</i> cv. Pampa INTA (planta hospedeira).	47
Figura 13: Média dos pesos secos dos respetivos isolados de <i>L. parviflorus</i> e de <i>L. uliginosus</i> , e controlos em <i>L. tenuis</i> cv. Esmeralda (planta hospedeira).	48
Figura 14: Gel de eletroforese de DNA genómico extraído dos isolados em estudo.	49
Figura 15: Géis de eletroforese de DNA genómico extraído dos isolados em estudo, com as respetivas diluições.	49
Figura 16: Dendograma dos perfis da amplificação por ERIC-PCR dos isolados de <i>L. parviflorus</i> .	50
Figura 17: Dendograma dos perfis da amplificação por REP-PCR dos isolados de <i>L. uliginosus</i> .	51
Figura 18: Exemplo da amplificação do gene 16S rRNA referente aos isolados de <i>L. parviflorus</i> .	52
Figura 19: Filogenia dos isolados de <i>L. parviflorus</i> com base no gene 16S rRNA.	53
Figura 20: Exemplo da amplificação do gene 16S rRNA por parte dos isolados de <i>L. uliginosus</i> .	54
Figura 21: Filogenia dos isolados de <i>L. uliginosus</i> com base no gene 16S rRNA.	55
Figura 22: Amplificação do gene <i>recA</i> referente aos isolados de <i>L. parviflorus</i> .	56
Figura 23: Amplificação do gene <i>atpD</i> referente aos isolados de <i>L. parviflorus</i> .	57

Figura 24:	Amplificação do gene <i>glnII</i> referente aos isolados de <i>L. parviflorus</i> .	57
Figura 25:	Filogenia dos isolados de <i>L. parviflorus</i> com base no gene <i>recA</i> .	59
Figura 26:	Filogenia dos isolados de <i>L. parviflorus</i> com base no gene <i>atpD</i> .	60
Figura 27:	Filogenia dos isolados de <i>L. parviflorus</i> com base no gene <i>glnII</i> .	61
Figura 28:	Amplificação do gene <i>recA</i> referente aos isolados de <i>L. uliginosus</i> .	62
Figura 29:	Amplificação do gene <i>glnII</i> referente aos isolados de <i>L. uliginosus</i> .	62
Figura 30:	Filogenia dos isolados de <i>Lotus uliginosus</i> , segundo os genes concatenados, <i>recA</i> e <i>glnII</i> .	63
Figura 31:	Amplificação do gene <i>nodC</i> e <i>nifH</i> referente aos isolados de <i>Lotus parviflorus</i> (Lp11) e de <i>L. uliginosus</i> (Lu4, Lu17 e Lu20).	64
Figura 32:	Filogenia dos isolados de <i>Lotus parviflorus</i> (Lp11) e de <i>L. uliginosus</i> (Lu4, Lu17 e Lu20) com base no gene <i>nodC</i> .	65
Figura 33:	Filogenia dos isolados de <i>Lotus parviflorus</i> (Lp11) e de <i>L. uliginosus</i> (Lu4, Lu17 e Lu20) com base no gene <i>nifH</i> .	66
Figura 34:	Eletroforese resultante da amplificação por ERIC-PCR de isolados provenientes de inóculos mistos: Lp11-8 V, Lp11-8 IV, Lp11-9 I, Lp11-9 II e Lp11-13a IX, e dos isolados Lp8, Lp9, Lp11 e Lp13a.	68
Figura 35:	Eletroforese da amplificação por ERIC-PCR do isolado proveniente de inóculo misto, Lp11-5a XIII, e dos isolados Lp5a e Lp11.	69
Figura 36:	Eletroforese da amplificação por ERIC-PCR do isolado proveniente de inóculo misto, Lp7b-11 VI, e dos isolados Lp7b e Lp11.	69
Figura 37:	Amplificação do gene <i>recA</i> relativamente aos isolados das inoculações mistas.	70
Figura 38:	Géis de eletroforese da amplificação por REP-PCR das estirpes de <i>L. uliginosus</i> isoladas neste estudo e das estirpes descritas em Lorite <i>et al.</i> (2012), e respetivo dendograma.	93

Índice das tabelas

	Página
Tabela 1: Resumo dos vários tratamentos efetuados, no ensaio de inoculação mista, utilizando como planta hospedeira <i>L. uliginosus</i> .	33
Tabela 2: Absorção de vermelho de congo (VC) e reação em azul de bromotimol/velocidade de crescimento dos isolados de <i>L. parviflorus</i> .	38
Tabela 3: Absorção de vermelho de congo (VC) e reação em azul de bromotimol/velocidade de crescimento dos isolados de <i>L. uliginosus</i> .	39
Tabela 4: Resultado dos ensaios de nodulação efetuados com as várias plantas hospedeiras do género <i>Lotus</i> , inoculadas com os isolados de <i>L. parviflorus</i> e de <i>L. uliginosus</i> .	41
Tabela 5: Fenótipo de nodulação resultante do ensaio de inoculação mista.	67
Tabela 6: Características dos isolados das inoculações mistas.	68
Tabela 7: Percentagens de identidade (Id.) dos alinhamentos efetuados para os isolados dos ensaios de inoculação mista em relação ao gene <i>recA</i> .	71
Tabela 8: Percentagens de identidade (Id.) dos alinhamentos efetuados para os isolados dos ensaios de inoculação mista com as sequências mais homólogas do NCBI e com o isolado Lp11-11 IV.	71
Tabela 9: Produção de sideróforos pelos isolados bacterianos em estudo.	72
Tabela 10: Hidrólise da Celulose pelos isolados de <i>L. parviflorus</i> e <i>L. uliginosus</i> .	73
Tabela 11: Inibição do crescimento de <i>P. cinnamomi</i> e <i>B. corticola</i> pelos isolados de <i>L. parviflorus</i> e <i>L. uliginosus</i> .	74
Tabela 12: Média do peso seco da parte aérea das várias plantas hospedeiras <i>Lotus</i> inoculadas com os isolados de <i>L. parviflorus</i> e de <i>L. uliginosus</i> , e com os respetivos controlos.	97

Glossário

ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina do soro bovino
cv.	Cultivar
d	Dia
D.O.	Densidade ótica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNTP's	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
g	Gramas
h	Hora
H₂O Milli-Q	Água ultrapura
H₂O_d	Água destilada
HDTMA	Hexa-decil-tri-metil-amónia
<i>In silico</i>	Simulação computacional
Kb	Kilo bases
L	Litro
M	Molar
mg	Microgramas
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
N	Norte
ng	Nanogramas
nt	Nucleótido
°C	Graus celsius
p/v	Peso por volume
pb	Pares de bases
pH	Potencial hidrogeniônico
PIPES	Ácido piperazinadietanosulfônico
<i>Primers</i>	Oligonucleótidos iniciadores
r.p.m.	Rotações por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
seg	Segundo
TBE	Tris-borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidade de atividade enzimática
UV	Ultravioleta
W	Oeste
µl	Microlitro

μM

Micromolar

1. Introdução

1.1 Fixação biológica de azoto

O azoto é um elemento essencial para o desenvolvimento das plantas. Faz parte da composição dos aminoácidos, dos quais, em geral, todos os seres vivos dependem. Na agricultura de hoje são empregues fertilizantes industriais que facilmente satisfazem as necessidades de azoto das plantas (Chen *et al.*, 2002; Ferguson *et al.*, 2010). No entanto, no processo de formação destes fertilizantes (síntese do amoníaco através de azoto e hidrogénio; processo Haber-Bosch) (Haber, 1910), onde são usadas temperaturas e pressões na ordem dos 500°C e 200 a 600 atm, respetivamente, é requerida uma enorme quantidade de energia (Sylvester-Bradley *et al.*, 1988). Assim, 50 % do uso dos combustíveis fósseis na agricultura são dispensados somente para a fixação industrial de azoto, o que comporta um preço e um gasto de recursos naturais elevadíssimos. Para além deste fato, o uso de fertilizantes também contribui para a contaminação dos lençóis freáticos, por lixiviação de compostos azotados, e para o aumento dos gases de efeito de estufa, que ocorre devido ao CO₂ libertado dos combustíveis fósseis. O aumento do efeito de estufa agrava-se ainda mais, pela libertação, durante a decomposição dos fertilizantes, de óxido nitroso (N₂O). Este gás é 292 vezes mais ativo para o efeito de estufa do que o CO₂ (Crutzen *et al.*, 2008; Graham & Vance, 2003). A fixação biológica de azoto é assim, uma alternativa muito mais “verde”.

Apenas alguns seres procarióticos podem fixar o azoto atmosférico, tornando-o disponível para as plantas na forma de amónia. Ao contrário dos diazotróficos (bactérias que fixam o azoto atmosférico) de vida livre, como por exemplo, *Azotobacter* spp. e *Azospirillum* spp., no caso do rizóbio existe uma endossimbiose com a formação de nódulos radiculares. O microssimbionte é alojado neste novo órgão, onde possui as condições ideais para fixar o N₂ (Markmann & Parniske, 2009).

1.1.1 Taxonomia do rizóbio

O género *Rhizobium* foi originalmente criado e descrito por Frank (1889), para incluir todas as bactérias fixadoras de azoto, presentes nos nódulos, e em associação

simbiótica com as leguminosas (pertencentes à família das *Fabacea*). Atualmente, rizóbio é um grupo parafilético de bactérias do solo, que é posicionado na ordem *Rhizobiales* e compreende 11 géneros de bactérias classificadas nas α -*Proteobacteria*: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer*, *Phyllobacterium*, *Microvirga*, *Azorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Methylobacterium*, *Devosia*, *Shinella*. Contem também 2 géneros dentro das β -*Proteobacteria*: *Cupriavidus* e *Burkholderia* (<http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>). Genericamente, as bactérias do grupo rizóbio são bacilos gram-negativos, aeróbios, não formadores de endosporos e com motilidade flagelar (Crozat *et al.*, 1982).

Geralmente é requerida uma alta especificidade entre o rizóbio e a planta para que o nódulo seja formado, como por exemplo, *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, que apenas nodula espécies do género *Trifolium*. No entanto, existem também casos de outros rizóbios menos específicos como *Rhizobium sp.* NGR234, que nodula leguminosas de 122 géneros diferentes e plantas do género *Parasponia*, que é o único caso de não leguminosas, em endossimbiose com rizóbio (Estrella *et al.*, 2009; Pueppke & Broughton, 1999).

Como os genes simbióticos estão associados a elementos móveis do genoma (“ilhas genéticas” e plasmídeos), a filogenia dos “housekeeping genes” (genes que foram conservados no decurso da evolução e que mantêm o correto funcionamento celular) e 16S rRNA é muito frequentemente divergente dos genes simbióticos. Daí resulta que muitas leguminosas interajam não só com um género de rizóbio (Laguerre *et al.*, 2001).

1.1.2 Organogénese do nódulo

O processo de nodulação inicia-se pela libertação de exsudados da raiz, constituídos principalmente por flavonóides fenólicos, que provocam a atração por quimiotaxia e a expressão de genes de nodulação (genes *nod*) por parte de rizóbios compatíveis. Esta expressão de genes *nod*, resulta na produção de fatores de nodulação (*nod*) (Long, 1996). Fatores *nod* são lipo-quito-oligossacáridos constituídos por uma estrutura oligomérica de 3 a 5 unidades de β -1,4-N-acetil-D-glucosaminas. Possuem modificações ou substituições no resíduo terminal redutor e no não redutor, que conferem a maior especificidade destes fatores *nod* (Figura 1) (Long, 1996; Spaink, 2000). São estes fatores *nod* que vão provocar a organogénese do nódulo. Inicialmente a expressão de fatores *nod* provoca a curvatura do

pelo radicular (Figura 2a), onde é depois formado um local de lesão, que se pensa que é

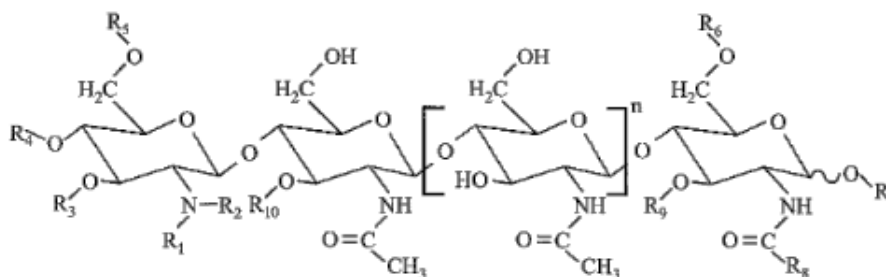


Figura 1: Estrutura geral dos Fatores *nod*, sendo *n* o número de unidades de N-acetil-D-glucosaminas possíveis no resíduo em questão (0-2), e R os locais das modificações. Adaptado de D’Haeze and Holsters (2002).

desencadeado pelo rizóbio e/ou pela própria planta através de enzimas degradadoras da parede celular (celulases e pectinases) (Robledo *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2012). Deste modo, é permitida a entrada dos rizóbios envoltos no pelo radicular. Ao entrarem, forma-se uma estrutura tubular que engloba a zona da infecção pelo depósito de materiais derivados da parede celular. Esta estrutura tubular vai crescendo em direção ao córtex e é designado conjuntamente com os rizóbios em proliferação, por cordão de infecção (Figura 2b) (Kamboj *et al.*, 2008; Schultze & Kondorosi, 1998).

Ao mesmo tempo que se dá o desenvolvimento dos cordões de infecção, no córtex da raiz algumas células dividem-se para formar um nódulo primordial, para onde os cordões de infecção se dirigem (Figura 2c). No nódulo primordial, os microssimbiontes são

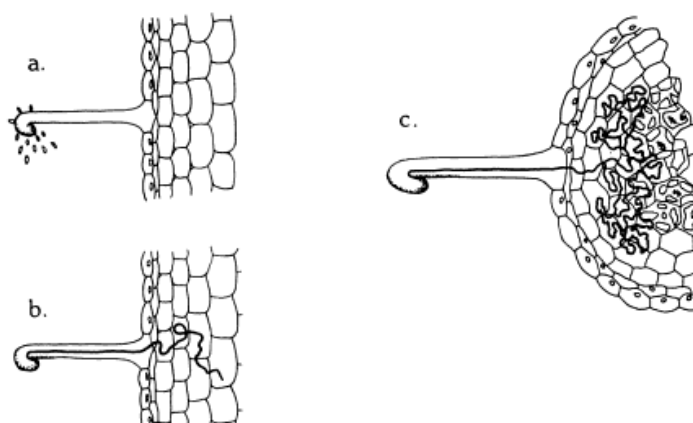


Figura 2: Representação esquemática do processo de nodulação Rizóbio-Leguminosa. **a.:** Atração de rizóbios por compostos secundários da planta e curvatura do pelo radicular. **b.:** Formação de cordões de infecção. **c.:** Colonização do nódulo primordial por parte dos endossimbiontes. Adaptado de Sylvester-Bradley *et al.*, (1988).

libertados dos cordões de infecção e por endocitose são envolvidos pela membrana plasmática da planta (chamada neste caso de membrana peribacteroidal). Nesta fase, os endossimbiontes diferenciam-se em células que não se dividem mais, apelidadas de bacteróides, que podem começar a fixar azoto (Figura 3) (Kamboj *et al.*, 2008; Udvardi & Day, 1997). Dependendo do local onde o primórdio do nódulo é iniciado, podem ser formados nódulos indeterminados ou determinados. Os nódulos indeterminados, são iniciados no interior do córtex da raiz e, por isso, preservam um meristema apical e crescem durante toda a sua existência. Os nódulos determinados não mantêm um meristema apical ativo, têm início na parte exterior do córtex da raiz, e têm uma limitação de tempo de existência (Hirsch, 1992; Vikman & Vessey, 1993).

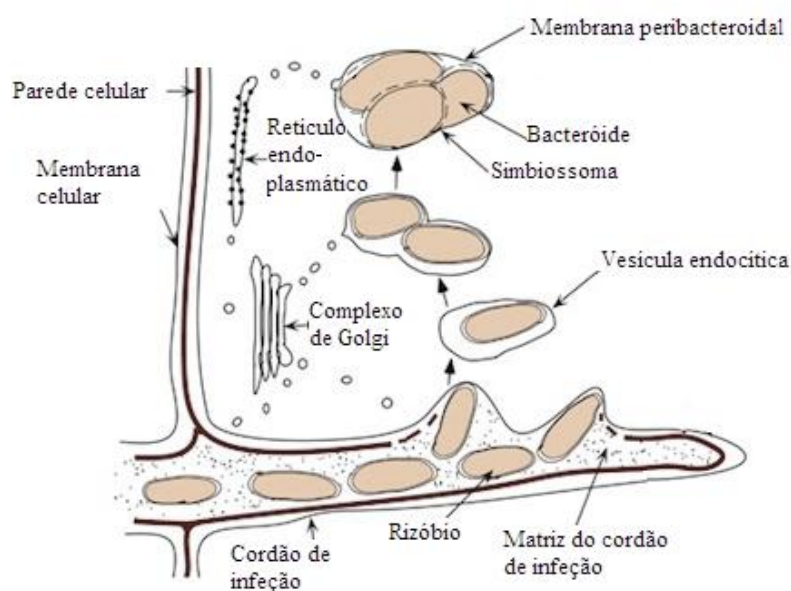


Figura 3: Diagrama da libertação de rizóbio dos cordões de infecção e consequente diferenciação em bacteróide. Adaptado de Whitehead & Day (1997).

A fixação de azoto é providenciada pela enzima nitrogenase, que converte o N_2 em NH_3 , forma esta de azoto que já pode ser utilizada pela planta (Newton, 2007). Esta fixação leva a um dispêndio extra de energia (ATP). Para que tal aconteça, a planta providencia aos bacteróides sacarose e ácidos dicarboxílicos. De modo a que a energia química destes compostos possa ser convertida em moléculas de ATP, através da respiração aeróbica, é necessário um ambiente oxidante. Contudo, um ambiente oxidante,

em demasia, inativa o componente II da nitrogenase. A própria expressão da enzima nitrogenase requer baixos níveis de O₂. Em células em equilíbrio com o ar a concentração de O₂ é de 250 µM, no entanto, no caso dos bacteróides é de 5-50 µM. O controle dos níveis de oxigénio é conseguido no nódulo pela camada de difusão de oxigénio em volta deste, e nos bacteróides pela presença de leghemoglobina, proteína transportadora de O₂, que ao ligar-se ao O₂, garante níveis de O₂ que não inativem a fixação de azoto (Appleby, 1984; Hunt & Layzell, 1993).

1.1.3 Genes da nodulação

Os genes envolvidos na nodulação estão divididos em dois grandes grupos: genes da formação de componentes extracelulares e genes de nodulação. Um exemplo dos primeiros, são os genes responsáveis pela formação de exopolissacáridos, lipopolissacáridos e polissacáridos capsulares. Estes genes estão envolvidos na adesão e nas primeiras etapas de infeção da planta (Kamboj *et al.*, 2008; Long, 1989).

Os genes de nodulação podem ser agrupados em três categorias. Genes comuns de nodulação (*nodABC*), genes específicos do hospedeiro (*hsn*) e genes regulatórios (*nodD*). Os genes regulatórios regulam a expressão destes genes de nodulação com a ajuda de certos compostos secundários da planta hospedeira. Os genes *nodABC* e os *hsn* têm como função a produção de fatores *nod*. Mais especificamente, os genes comuns de nodulação codificam a estrutura base dos fatores *nod* e são conservados em todos os simbioses que nodulam as leguminosas. Os genes específicos do hospedeiro variam de acordo com a bactéria que nodula, e representam as variações que os fatores *nod* podem tomar (Atkinson *et al.*, 1994; Kamboj *et al.*, 2008).

A transcrição dos vários genes da nodulação requer um indutor, um ativador transcricional, e um elemento regulador *cis*. O indutor corresponde aos exsudados libertados pela planta, o ativador à proteína *nodD* e o elemento *cis* à *nodBOX*, onde o complexo *nodD*-flavonóide se liga e ativa a transcrição dos restantes genes de nodulação. A estrutura da proteína *nodD* difere nos diferentes rizóbios, e determina qual o flavonóide que vai atuar como indutor da expressão dos restantes genes *nod*. Deste modo, a especificidade do complexo *nodD*-flavonóide corresponde ao primeiro passo para a nodulação. Estas proteínas *nodD*, pertencem à família de ativadores transcripcionais LysR

(família que possui o aminoácido lisina no centro ativo), que possuem no terminal N um motivo conservado “*helix-turn-helix*” que se liga ao DNA na *nod*BOX. O terminal C é menos conservado e está envolvido na ligação ao flavonóide. Muitos rizóbios possuem múltiplos genes *nodD* (diferentes), sendo que a especificidade ao hospedeiro resultante será variável, como já foi referido, pelo exemplo da capacidade que *Rhizobium sp.* NGR234 tem em nodular diversas plantas (Kamboj *et al.*, 2008; Long, 1989).

A localização dos genes simbióticos, onde estão incluídos os genes *nod* não é igual em todos os géneros de rizóbio. Alguns géneros de rizóbio como *Rhizobium* e *Sinorhizobium* possuem megaplasmídeos (pSym) que contêm os genes *nod* e *nif* responsáveis pela simbiose (Long, 1984; Velázquez *et al.*, 2005). Ao invés, outros géneros, como por exemplo, *Bradyrhizobium*, possui os seus genes simbióticos em “ilhas genéticas” no cromossoma (Göttfert *et al.*, 2001; MacLean *et al.*, 2007).

1.1.4 Género *Lotus*

Lotus sp., é um género cosmopolita com 150 espécies que ocupam maioritariamente a região mediterrânica (que inclui partes da Ásia, África e Europa) e o ocidente dos Estados Unidos (Allan *et al.*, 2004). São geralmente usados para melhorar pastagens, quando outras leguminosas não o conseguem fazer. Assim, são capazes de tolerar solos ácidos, inférteis e contaminados com metais pesados (Blumenthal & McGraw 1999; Márquez & Stougaard, 2005). Algumas espécies deste género têm sido “domesticadas” e melhoradas através de seleção artificial. Estas espécies são respetivamente: *L. corniculatus*, *L. tenuis* (também designada por *Lotus glaber*), *L. uliginosus* (também designada por *L. pedunculatus*) e *L. subiflorus*. Está ainda incluído neste género, *L. japonicus*, que é a espécie-modelo das leguminosas para estudos genéticos e fisiológicos, nomeadamente na interação planta-rizóbio (Márquez & Stougaard, 2005), devido a uma série de características que possui, como um curto ciclo de vida, autopolinização e um pequeno genoma (Sato *et al.*, 2008).

Em contraste com espécies de elevado interesse agrícola (como os géneros *Vicia*, *Trifolium* e *Pisum*), o género *Lotus* não tem sido tão intensamente estudado, sendo que a maioria das interações entre *Lotus* e as bactérias rizóbio, permanecem inexploradas (Lorite *et al.*, 2010a,b).

Inicialmente pensava-se que *Lotus spp.* apenas formaria simbioses com rizóbios de crescimento lento (*Bradyrhizobium*) e intermédio (*Mesorhizobium*). Por exemplo, *L. corniculatus* e *Lotus japonicus*, são nodulados efetivamente por *Mesorhizobium loti* e *L. uliginosus* e *Lotus angustissimus*, por espécies do género *Bradyrhizobium*. No caso de *L. uliginosus*, está descrito que se associa simbioticamente com as espécies: *Bradyrhizobium sp.* (*Lotus*) e *Bradyrhizobium japonicum* (Batista *et al.*, 2013; Cooper *et al.*, 1985; Lorite *et al.*, 2012). No entanto, atualmente tem-se verificado que vários géneros de rizóbio estabelecem interações específicas com *Lotus*, como: *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Agrobacterium* e *Aminobacter* (Estrella *et al.*, 2009; Lorite *et al.*, 2010a; Lorite *et al.*, 2010b). Para estas novas descobertas tem contribuído bastante o facto de se ter vindo a estudar plantas silvestres, cujo potencial de diversidade é maior.

1.2 Outras atividades promotoras de crescimento vegetal

A rizosfera representa um ambiente rico em nutrientes para os microrganismos, pois nesta há a acumulação de diversos exsudados das raízes das plantas, por exemplo, hidratos de carbono e aminoácidos. Devido a este facto, a concentração de microrganismos no solo é de 10 a 100 vezes superior na rizosfera, quando comparada com solo sem vegetação. As bactérias presentes na rizosfera são chamadas de rizobactérias e podem estabelecer vários tipos de associações (Weller & Thomashow 1994; Gray & Smith 2005). Algumas são patogénicas, outras neutras e ainda outras são benéficas. As benéficas são usualmente apelidadas de *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR)* (Kloepper *et al.*, 1989).

As *PGPR* estimulam o crescimento vegetal, diretamente pela produção de fitohormonas e solubilização de minerais e nutrientes requeridos para a planta (Glick, 1995). As fitohormonas do grupo das auxinas, como por exemplo, o ácido indol acético (IAA), promovem a divisão celular e o enraizamento (Okon & Kapulnik, 1986). Para além do azoto, outros elementos, como o fósforo, fazem também parte dos macronutrientes necessários ao desenvolvimento das plantas. No caso do fósforo, a sua importância ainda é acrescida pelo facto de não existir em nenhum grande reservatório de fácil acesso, como acontece, por exemplo, no azoto existente na atmosfera (Ezawa *et al.*, 2004). Os

microrganismos designados de solubilizadores de fosfato são capazes de transformar o fósforo insolúvel de fontes orgânicas e inorgânicas em formas biodisponíveis, através de processos de solubilização e/ou mineralização. A solubilização do fósforo inorgânico ocorre por intermédio de ácidos orgânicos, que dissolvem minerais de fosfato ou quelatam elementos ligados ao fósforo, libertando-o em solução (He *et al.*, 2007).

Indiretamente as *PGPR* estimulam o crescimento vegetal pelo antagonismo a agentes fitopatogénicos existentes na rizosfera (Glick, 1995). Como exemplo, tem-se a *Phytophthora cinnamomi* e *Botryosphaeria cortícola*, que são importantes agentes fitopatogénicos. De modo a poderem colonizar o espaço em redor da rizosfera, certas *PGPR* produzem substâncias, como antibióticos, bacteriocinas e sideróforos, que inibem o crescimento de patógenos. Também podem ter uma ação antagonista pela indução de resistência a estes agentes patogénicos e colonização do espaço (Glick, 1995). O fungo *Botryosphaeria cortícola* infeta principalmente árvores do género *Quercus*, como o sobreiro e a azinheira. Provoca uma morte progressiva em vários tecidos vegetais, causando doenças designadas por cancro e murchidão (Alves *et al.*, 2004). Por sua vez, *P. cinnamomi* está associada a cerca de 3000 espécies de plantas. Danifica as raízes das plantas, mas também outros tecidos. Causa podridão das raízes, doença da tinta e também murchidão (Hardham, 2005). Agentes fitopatogénicos de difícil controlo, como estes, têm causado grandes perdas às indústrias associadas a estas árvores e plantas afetadas, sendo por isso, importante a procura de novas estratégias (Brasier, 1996).

1.3 Objetivos

O corrente trabalho teve como objetivo estudar as bactérias isoladas dos nódulos de *L. parviflorus*, uma espécie silvestre, que nunca antes foi estudada a este nível, e de *L. uliginosus*. Ambas as plantas foram colhidas na zona de Estarreja. Assim, pretendeu-se neste trabalho caracterizar os isolados quanto à morfologia, à capacidade de nodulação e avaliação da eficácia simbiótica, à diversidade e ainda quanto à filogenia dos genes 16S rRNA, *housekeeping* (*glnII*, *recA* e *atpD*) e simbióticos (*nodC* e *nifH*). Também a avaliação de outras atividades promotoras de crescimento vegetal que estas bactérias possam ter, para além da fixação do azoto, foram efetuadas, bem como o estudo

relacionado com o antagonismo dos isolados frente a importantes agentes fitopatogénicos, como é o caso da *Phytophthora cinnamomi* e da *Botryosphaeria cortícola*.

2. Materiais

2.1 Material biológico

Utilizaram-se um total de 22 estirpes de bactérias isoladas dos nódulos de duas espécies de plantas do género *Lotus*: *L. parviflorus* (13 estirpes, designadas por isolados Lp) e *L. uliginosus* (9 estirpes, designadas por isolados Lu), da zona de Estarreja, Aveiro (Figura 4). Estes isolados foram designados, mais especificamente, por: Lp5a, Lp5b, Lp6, Lp7a, Lp7b, Lp8, Lp9, Lp10, Lp11, Lp12, Lp13a, Lp13b, Lp14, Lu1, Lu2, Lu4, Lu8, Lu13, Lu16, Lu17, Lu20 e Lu35. Os 9 isolados Lu resultaram de uma seleção anterior (Anexo I: Figura 38).

Utilizaram-se 4 espécies de plantas hospedeiras do género *Lotus* para os ensaios de nodulação: *Lotus tenuis* cv. Esmeralda, *Lotus tenuis* cv. Pampa INTA, *Lotus corniculatus* cv. S. Gabriel, *Lotus uliginosus* cv. Sunrise e *L. parviflorus* silvestre. As sementes de *L. parviflorus* silvestre foram colhidas em Samora Correia (Distrito de Lisboa), em locais da empresa Companhia das Lezírias, GPS: 38° 49' 24''N, 8° 60' 7.6W e 38° 49' 24.7 ''N, 8° 50' 36.8 W.

Para os ensaios de antagonismo a fitopatogénios foram utilizadas: duas estirpes de *Phytophthora cinnamomi* (código: PH1186 e PH1160) e uma de *Botryosphaeria corticola* (código: CH7), isoladas de *Quercus suber* no concelho de Grândola.



Figura 4: Localização da zona de amostragem (Estarreja no mapa).

2.2 Meios de cultura

Os meios de cultura, após preparação, foram esterilizados em autoclave a 120 °C e 1 bar, durante 15 min.

- Meio de agar de manitol-levedura (AML) (Vincent, 1970):

H ₂ O	1 L
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Manitol	10 g
Extrato de levedura	0,4 g
Agar	15 g
pH	7,0

- Meio de manitol-levedura líquido (ML):

Tem igual composição ao AML, mas sem a adição de agar.

- Meio de agar de manitol-levedura (AML) com vermelho de congo (VC):

AML	1L
VC	0,025g

- Meio de agar de manitol-levedura (AML) com azul de bromotimol (BTB):

AML	1L
BTB	0,025g

- Meio de triptona-levedura (TY) (Beringer, 1974):

H ₂ O	1 L
Triptona	5 g
Extrato de levedura	3 g

CaCl ₂ .2H ₂ O	0,88 g
Agar	15g

- Meio de triptona-levedura (TY) líquido:

Tem igual composição ao TY, mas sem a adição de agar.

- Meio de Jensen (Jensen, 1941):

H ₂ O	1 L
CaHPO ₄	1 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,2 g
FeCl ₃	0,1 g
Solução de micronutrientes***	1 ml
Agar	12 g

- Meio de Jensen líquido a 1/4

H ₂ O	1 L
CaHPO ₄	0,25 g
K ₂ HPO ₄	0,05 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g
NaCl	0,05 g
FeCl ₃	0,025 g
Solução de micronutrientes***	0,25 ml

*** Solução de micronutrientes:

H ₂ O	1 L
H ₃ BO ₃	2,8 g
MnSO ₄	1,39 g
ZnCl ₂	0,1 g
MoO ₃	0,071 g
SO ₄ Cu ₃ .3H ₂ O	0,078 g

- Meio de dextrose-levedura (YED) (Illmer *et al.*, 1995):

H ₂ O _d	1 L
Extrato de levedura	5 g
Glucose	10 g
Agar	20 g

- Meio de agar de batata-dextrose (PDA) (Yarrow, 1998):

H ₂ O _d	1 L
Infusão de batata	300 g
Glucose	20 g
Agar	20 g

2.3 Soluções

- Solução CAS (Pérez-Miranda *et al.*, 2007):

Dissolver cada um dos reagentes da Solução A em separado. Misturar primeiro *Chrome azurol S*, seguido de Fe(NO₃)₃. Misturar a solução A com a solução B na razão de 1 volume de solução A para 7,5 volumes de solução B.

Solução A

H ₂ O _d	100 ml
<i>Chrome azurol S</i> (CAS)	60,5 mg
Fe(NO ₃) ₃	665,5 mg
HDTMA	72,9 mg

Solução B

H ₂ O _d	750 ml
PIPES	30,24 g
Agarose	15 g
pH	6,8

2.4 Tampões

- Tris HCl:

H ₂ O	1 L
Tris	1,2114 g
pH (ajustado com HCl)	8,0

- TE:

H ₂ O	1 L
Tris	1,2114 g
EDTA	0,2922 g
pH (ajustado com HCl)	8,0

- TBE (10x concentrado):

H ₂ O	1 L
Tris	108 g
Ácido bórico	55 g
EDTA	9,3 g
pH	8,3

2.5 Agaroses

- Agarose a 0,8 %

TBE (1x)	400 ml
Agarose (Pronadisa's D1 Low EEO)	3,6 g

- Agarose a 1 %

TBE (1x)	400 ml
Agarose (Sigma –Type II)	4 g

- Agarose a 1,2 %

TBE (1x)	400 ml
----------	--------

Agarose (Sigma –Type II) 4,4 g

2.6 Marcadores de pesos moleculares

- Fago λ digerido com *Hind* II, Gene Ruller (com pesos moleculares de 564 bp a 23130 bp)
- Marcador 100 pb plus, Gene Ruller (com pesos moleculares de 100 pb a 3 kb)
- Marcador 1 kb, Gene Ruller (com pesos moleculares de 250 pb a 10 kb)

2.7 Corantes para ácidos nucleicos

- Brometo de etídio (0,5 μ l/ml)
- Gel red (0,9 μ l/ml)

2.8 Termocicladores

- Electron Corporation Px2
- Biorad T100 T.C.
- Eppendorf Mastercycler Gradient

3. Métodos

3.1 Crescimento e armazenamento dos isolados

As bactérias utilizadas, tinham sido previamente isoladas dos nódulos de *L. parviflorus* e de *L. uliginosus*, e encontravam-se armazenadas a 4 °C em frascos de AML. Foram efetuados os reisolamentos destas culturas para meio AML com VC e foram incubadas durante 3 - 8 dias a 28 °C. Sempre que existisse mais do que uma UFC (Unidade formadora de Colónia) com aspeto e absorção de VC diferente procedeu-se ao isolamento destas colónias para novas placas de AML com VC, dando origem a isolados com o mesmo nº, mas com diferentes letras, designando-os de **a, b, c**,... etc.

Os diferentes isolados foram depois armazenados em frascos rolhados contendo meio AML, no frigorífico a 4°C, e em tubos com meio TY líquido contendo 20 % de glicerol a - 80 °C.

O crescimento em AML com VC e AML com BTB, dos diferentes isolados, foi analisado, anotando-se a absorção de VC e velocidade de crescimento, respetivamente. Geralmente as bactérias rizóbio não absorvem ou absorvem levemente o VC. O corante ou indicador de pH BTB, muda de cor para amarelo, quando o meio é acidificado, característica de estirpes de crescimento rápido. Permanece verde ou muda para azul, não alterando ou mesmo aumentando o pH do meio, em estirpes de crescimento lento. Estes dois corantes permitiram, deste modo, uma rápida caracterização fenotípica dos isolados em estudo (Somasegaran & Hoben, 1994).

3.2 Ensaios de nodulação

Com vista a testar os isolados quanto à capacidade de nodular diferentes espécies de *Lotus* e de promover os respetivos crescimentos vegetais, foram efetuados ensaios com as seguintes plantas hospedeiras: *L. tenuis* cv. Esmeralda, *L. tenuis* cv. Pampa INTA, *L. corniculatus* cv. S. Gabriel, *L. uliginosus* cv. Sunrise e *L. parviflorus* silvestre.

3.2.1 Esterilização das sementes

Para a esterilização da superfície das sementes das diferentes espécies de *Lotus*, procedeu-se à imersão das sementes em álcool (98 %), com agitação, durante 1 min e à lavagem com H₂O_d esterilizada. Em seguida, procedeu-se à imersão em HgCl₂ (0,1 %), com agitação, durante 4 min, seguindo-se seis lavagens sucessivas com H₂O_d, de modo a retirar o HgCl₂. Deixaram-se as sementes 1 a 2 h em H₂O_d, a hidratar, de forma a quebrar a dormência (Somasegaran & Hoben, 1994).

3.2.2 Germinação das sementes

Após a esterilização, as sementes foram germinadas em placas contendo agar de água a 0,8 %, na estufa a 27 °C, e no escuro, até que a radícula medisse entre 1 - 2 mm de comprimento (Somasegaran & Hoben, 1994).

3.2.3 Inoculação

As plântulas pré-germinadas foram transferidas, em condições assépticas, para frascos com meio de Jensen inclinado e cobertos por papel celofane com uma abertura preenchida por algodão. Colocou-se uma plântula por frasco. As plântulas foram inoculadas com aproximadamente 10⁸ células de cada uma das culturas bacterianas, previamente crescidas em AML e ressuspensas em meio de Jensen líquido a ¼ (1 ml de suspensão celular por planta). Para além dos inóculos com cultura bacteriana, foram efetuados dois controlos. Num dos controlos adicionou-se 1 ml de 1,75 % *p/v* de KNO₃ (TN) a cada planta. No outro adicionou-se apenas 1 ml de meio de Jensen líquido a ¼ a cada planta. Para cada isolado e controlo efetuaram-se 3 réplicas.

3.2.4 Avaliação da eficiência simbiótica

Após inoculação, as plântulas foram colocadas numa câmara climatizada com luz e temperatura controladas (fotoperíodo com 16 h de dia e 8 h de noite e temperaturas diurnas de 23 °C e noturnas de 18 °C). As plantas foram “regadas” com 2 ml de meio de Jensen

líquido a ¼ a cada duas semanas. Após 8 semanas, os ensaios foram retirados da câmara climatizada. Em seguida, anotou-se a presença/ausência de nódulos e as partes aéreas das plantas foram destacadas e colocadas numa estufa a 65°C durante 3 d, afim de se determinar os respectivos pesos secos. Através do peso seco determinou-se a eficácia da simbiose de determinado isolado no respetivo hospedeiro, usando a fórmula $ESR = [(PS - T0) \times 100] / (TN - T0)$, onde ESR representa a eficácia simbiótica relativa e PS o peso seco médio de um conjunto de 3 plantas que foram inoculadas com determinado isolado (Ferreira & Marques, 1992).

3.3 Caraterização molecular dos isolados

3.3.1 Extração de DNA genómico

A extração do DNA total ou genómico foi realizada com recurso a vários *kits* comerciais (*Real*, *Nucleospin tissue DNA extraction* e *Aqua pure Genomic DNA*), sendo o processamento das amostras efetuado segundo as especificações do protocolo que acompanhava cada *kit*, e que estão descritas no Anexo II. A extração do DNA total foi também realizada segundo o protocolo de extração descrito em Estrella *et al.* (2009), tendo-se efetuado os seguintes passos:

Obtenção de um precipitado celular

A partir de 3 ml de cultura em meio TY líquido e em fase logarítmica, centrifugou-se a 12000 r.p.m. durante 3 min e descartou-se o sobrenadante.

Degradação dos polissacáridos adjacentes às células

Adicionou-se ao “*pellet*” 100 µl de 0,1 % de Sarcosil em tampão TE, centrifugou-se e retirou-se o sobrenadante.

Destabilização da membrana celular

Ressuspendeu-se o “*pellet*” em 1 ml de NaCl (1 M), colocou-se a 4 °C durante 30 - 60 min, com agitações intercalares. Em seguida, centrifugou-se,

eliminou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se, até ficar homogêneo, em 250 µl de sacarose a 20 % em tampão TE.

Rompimento da parede celular e hidrólise de DNAses

Adicionou-se 250 µl de lisozima (5 mg/ml) e RNase (1 mg/ml) em TE. Ressuspendeu-se, por agitação no vórtex, e incubou-se durante 30 min a 37 °C. Em seguida, adicionou-se 100 µl de sarcosil a 5 % em tampão TE contendo 10 mg/ml de pronase, e incubou-se durante 1 h.

Precipitação das proteínas

Adicionou-se 70 µl de acetato de sódio (3 M) a pH = 5, e ainda 200 µl de uma mistura de fenol-clorofórmio na mesma proporção. De seguida adicionou-se fenol, agitou-se durante 3 min e centrifugou-se durante 5 min a 12000 r.p.m.. No final, passou-se, cuidadosamente, o sobrenadante para um novo tubo.

Precipitação do DNA

Adicionou-se 700 µl de propanol, misturando-se por inversão, e incubou-se durante 15 min a - 80 °C ou *overnight* (durante o período da noite, de um dia para o outro) a - 20 °C. De seguida, centrifugou-se durante 15 min a 12000 r.p.m. e eliminou-se o sobrenadante. Imediatamente a seguir, adicionou-se 500 µl de etanol a 70 %, centrifugou-se durante 15 min a 12000 r.p.m. e eliminou-se o sobrenadante. No final, secou-se numa câmara de vácuo.

Eluição do DNA

Adicionou-se 100 µl de H₂O Milli-Q (ou TE diluído de 1/10 ou Tris-HCl a 10 mM). Agitou-se no vórtex e incubou-se com algumas agitações intercalares a 65 °C durante 30 min.

3.3.2 PCR

A técnica de “*polimerase chain reaction*” (PCR) foi primeiramente usada e desenvolvida por Saiki *et al.* (1988), e desde logo colmatou as limitações de sensibilidade e detecção inerentes às técnicas de hibridação DNA-DNA usadas até essa data.

A amplificação é conseguida através de dois pequenos fragmentos de DNA, que atuam como fragmentos de Okazaki, e que formam especificamente os extremos da região a amplificar, pela taq polimerase, na molécula de DNA alvo. Para que a amplificação seja possível é necessário que os produtos da reação de PCR passem por diferentes temperaturas, pois são necessárias várias etapas com objetivos diferentes. Tecnicamente, é alcançado por ciclos, onde primeiramente a temperatura se eleva a 94 °C, para que a dupla hélice de DNA se desenlace. Numa segunda parte dá-se a hibridação dos oligonucleótidos ou “*primers*”, onde se baixa a temperatura para 40 °C a 65 °C, dependendo das características dos oligonucleótidos e produto a amplificar. Numa terceira fase a temperatura é elevada para os 72 °C, que é a temperatura ótima para que a Taq polimerase (termostável) atue, alongando a cadeia a amplificar (Marinus, 1976).

Tipicamente é necessário colocar num tubo de PCR: o DNA alvo, *primers* específicos, desoxirribonucleotídeos trifosfatados, iões magnésio, tampão da Taq polimerase e Taq polimerase termostável. Os desoxirribonucleotídeos trifosfatados (C-Citosina, G-Guanina, T-Timina, A-Adenina) são os “blocos de construção” da reação de PCR e o MgCl₂ atua como cofator da polimerase (van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

É aconselhado que as reações de PCR incorporem um controlo positivo e um controlo negativo. O controlo positivo exclui a possibilidade de haver um “falso negativo” pela fraca qualidade de um ou mais reagentes na reação ou erro humano na montagem da mistura de PCR. O controlo negativo garante que não há contaminação das amostras (van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

Os fragmentos amplificados, depois de corados, são usualmente visualizados em gel submetido à eletroforese. A eletroforese consiste na separação de moléculas com carga elétrica pela aplicação de um campo elétrico, onde neste caso o DNA, como possui carga global negativa, desloca-se para o polo positivo. Os diferentes fragmentos correm com velocidades diferentes, consoante o tamanho que possuem, o que permite determinar os

respetivos tamanhos relativos recorrendo a um marcador de pesos moleculares conhecidos (Sambrook & Russell, 2001).

As concentrações de DNA, após extração, foram otimizadas em comparação com os marcadores de pesos moleculares 1 kb e Fago λ digerido com *Hind* II.

3.3.3 Amplificação de sequências repetitivas

3.3.3.1 ERIC-PCR

Após a extração de DNA dos isolados de *L. parviflorus*, procedeu-se às respetivas amplificações por reações de ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intragenic Consensus sequence-based*) - PCR, que pela amplificação de sequências repetitivas no genoma produz um padrão de fragmentos amplificados, único de isolado para isolado.

Os *primers* utilizados nesta reação foram os seguintes (de Bruijn, 1992):

- ERIC1R (*Forward*): 5' - ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC - 3'

- ERIC2 (*Reverse*): 5' - AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG - 3'

Para cada amostra, a mistura de reação continha:

Kit-Taq-Mix Qiagen	15,8 μ l
Taq polimerase	2,5 U
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPs	200 μ M
ERIC1R (MWG Biotech AG - 10 pmol/ μ l)	1 μ l
ERIC2 (MWG Biotech AG - 10 pmol/ μ l)	1 μ l
DMSO (Sigma - 100%)	1 μ l
BSA (Sigma - 20 mg/ml)	0,2 μ l
DNA (~20 ng/ μ l)	1 μ l

As reações de PCR foram efetuadas num termociclador com as seguintes condições (Randemaker & de Bruijn, 1997):

Desnaturação inicial	95 °C, 2 min	1 ciclo
----------------------	--------------	---------

Desnaturação	94 °C, 30 seg	
Emparelhamento	50 °C, 1 min	30 ciclos
Extensão	65 °C, 8 min	
Extensão final	65 °C, 16 min	1 ciclo

Após a amplificação, fez-se uma eletroforese, em gel de agarose a 1% em TBE, colocando-se 10 µl de cada um dos produtos de PCR amplificados, com 3 µl de tampão de ressuspensão. Utilizou-se 3 µl de marcador de 1 kb e durante os primeiros 30 min a eletroforese decorreu a 70 Volts (V) e as restantes 3 h e 30 min a 80 V. Após a visualização do gel, os dados da imagem do gel gerados pelo sistema de imagem, foram utilizados para efetuar um dendograma representativo da diversidade dos isolados em estudo. Para tal, foram utilizados os programas *Quantity One* (visualização do gel), *TreeView* e *FreeTree* (construção de dendogramas), utilizando-se o coeficiente de *Dice*, o método *UPGMA* (*Unweighted Pair Group Arithmetic Average*) e um *Bootstrap* de 500 replicações.

3.3.3.2 REP-PCR

À semelhança de ERIC-PCR, foi efetuada uma amplificação por REP (*Repetitive extragenic palindromic*) - PCR aos isolados de *L. uliginosus*, tendo-se utilizado os seguintes *primers* (Versalovic, *et al.*, 1991):

- Rep1rI (*Forward*): 5' - XXXXCGXCGXCATCXGGC - 3'
- Rep2I (*Reverse*): 5' - XCGXCTTATCXGGCCTAC - 3'

Para cada amostra, a mistura de reação continha:

MgCl ₂ (Sigma - 50 mM)	7 µl
Tampão da taq polimerase (EuroLone – 10 X)	2,5 µl
dNTPs (Genecraft - 200 µM)	2,5 µl
DMSO (Sigma)	2,5 µl

Rep1rI (Sigma - 10 pmol/μl)	0,5 μl
Rep2I (Sigma - 10 pmol/μl)	0,5 μl
Taq polimerase (EuroLone - 5U/ μl)	0,8 μl
H ₂ O Milli-Q	5,7 μl
DNA (20 ng/ μl)	5 μl

As reações de PCR foram efetuadas num termociclador com as seguintes condições (Versalovic *et al.*, 1991):

Desnaturação inicial	95 °C, 6 min	1 ciclo
Desnaturação	94 °C, 1 min	30 ciclos
Emparelhamento	40 °C, 1 min	
Extensão	65 °C, 8 min	
Extensão final	65 °C, 16 min	1 ciclo

Após amplificação, os produtos PCR foram sujeitos a uma eletroforese, em gel de agarose a 1,2 % *p/v* em TBE, colocando-se 10 μl de cada um dos produtos de PCR amplificados, juntamente com 3 μl de tampão de ressuspensão e 5 μl de marcador 100 pb plus. A eletroforese correu durante 2 h a 80 V. Depois da corrida o gel foi corado em *gel red* durante 30 min. Após a visualização do gel num transiluminador, os dados da imagem gerados foram utilizados para efetuar um dendograma representativo da diversidade dos isolados de *L. uliginosus*. Utilizou-se para este fim o *software Infoquest FP* da *Bio-Rad*, onde foi usado o coeficiente de *Dice* e o método *UPGMA*.

3.3.4 Amplificação de genes

Para se determinar a filogenia dos isolados em estudo com base em genes conservados, foram amplificados os genes 16S rRNA e os genes *housekeeping*: *glnII*, *recA* e *atpD*. Foi necessário o “desenho de *primers*” adicionais para os genes 16S rRNA, *recA* e *atpD*.

De forma a tornar possível verificar a existência de genes simbióticos e a sua filogenia, amplificaram-se os genes *nodC* e *nifH*.

As eletroforeses em gel de agarose a 0,8 - 1 % em TBE, foram efetuadas após respetiva amplificação e decorreram durante 1 h a 90 V, com 2 µl de produto amplificado, marcador 1 kb ou 100 pb plus e de tampão de ressuspensão. Os géis foram corados com brometo de etídio ou *gel red*, durante 25 min. As bandas foram visualizadas e analisadas, no transiluminador, a 312 nm, integrado no equipamento de análise de imagem com o *software Quantity One*.

3.3.4.1 16S rRNA

O gene, altamente conservado, 16S rRNA, que codifica a subunidade menor de ribossomas procarióticos, foi amplificado segundo Herrera-Cervera *et al.* (1999) e Weisburg *et al.* (1991), utilizando-se como *primers* as seguintes sequências (Herrera-Cervera *et al.*, 1999):

- 41f (*Forward*): 5` - GCTCAGATTGAACGCTGGCG - 3`
- 1488r (*Reverse*): 5` - CGGTTACCTTGTTACGACTTCACC - 3`

O gene 16S rRNA, foi também amplificado com os *primers* de Weisburg *et al.* (1991):

- fD1 (*Forward*): 5` - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3`
- rD1 (*Reverse*): 5` - AAGGAGGTGATCCAGCC - 3`

No final da amplificação o fragmento esperado, de cerca de 1500 pb de tamanho, corresponde quase à totalidade deste gene.

Para cada amostra adicionaram-se os seguintes volumes de cada um dos reagentes:

Kit-Taq-Mix Qiagen	15,8 µl
Taq polimerase	2,5 U
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPs	200 µM
Primer fD1 (MWG Biotech AG - 10 pmol/µl)	1 µl
Primer rD1 (MWG Biotech AG - 10 pmol/µl)	1 µl
H ₂ O Milli-Q	1,2 µl

DNA genómico a amplificar (~20 ng/μl)	1 μl
---------------------------------------	------

A reação de PCR foi efetuada num termociclador com as condições referidas por Weisburg *et al.* (1991):

Desnaturação inicial	95 °C, 3 min	1 ciclo
Desnaturação	94 °C, 1 min	35 ciclos
Emparelhamento	55 °C, 1 min	
Extensão	72 °C, 2 min	
Extensão final	72 °C, 3 min	1 ciclo

Para alguns isolados foi necessário “desenhar *primers*” adicionais, de modo a que se pudesse completar, mais facilmente, a sequenciação, em falta, da respetiva zona intermédia. Assim, utilizaram-se os extremos dos fragmentos já sequenciados com o *primer forward* e *reverse*, para desenhar um *primer* intermédio numa zona mais conservada possível. O *primer* foi apelidado de “16SintR” e foi desenhado para a direção *reverse* com a seguinte sequencia: 5` - AAACACATGCTCCACCGCTTG - 3`.

3.3.4.2 Amplificação de genes *housekeeping*

3.3.4.2.1 *recA*

O Gene *recA* é responsável pela reparação do DNA. Amplificou-se parte deste gene, para o qual se espera a amplificação de fragmentos de 450 a 500 pb. Segundo Gaunt *et al.* (2001), utilizaram-se os seguintes *primers*:

Primer F (Forward)

- *recA6*: 5'- CGK CTS GTA GAG GAY AAA TCG GTG GA-3'

- *recA63*: 5'- ATC GAG CGG TCG TTC GGC AAG GG -3'

Primer R (Reverse)

- *recA504*: 5'- TTG CGC AGC GCC TGG CTC AT-3'

- *recA555*: 5'-CGR ATC TGG TTG ATG AAG ATC ACC AT -3'

Para cada amostra adicionaram-se os seguintes volumes de cada um dos reagentes:

Kit-Taq-Mix Qiagen	15,8 µl
Taq polimerase	2,5 U
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPs	200 µM
Primer F (Stabvida - 10 pmol/µl)	0,5 µl
Primer R (Stabvida - 10 pmol/µl)	0,5 µl
H ₂ O Milli-Q	2,2 µl
DNA (~20 ng/µl)	1 µl

Utilizaram-se as seguintes condições no termociclador (Gaunt *et al.*, 2001):

Desnaturação inicial	95 °C, 5 min	1 ciclo
Desnaturação	95 °C, 45 seg	
Emparelhamento	58 °C, 1 min	35 ciclos
Extensão	72 °C, 1 min 30seg	

3.3.4.2.2 *atpD*

Segundo Gaunt *et al.* (2001) foi amplificado parte do gene *atpD*, que codifica a subunidade β da enzima ATPase. A amplificação nestas condições resulta em fragmentos de cerca de 450 - 500 pb. De acordo com Gaunt *et al.* (2001) utilizaram-se os seguintes *primers*:

Primer F (Forward)

- *atpD* 273: 5'-SCTGGGSCGYATCMTGAACGT-3'

- *atpD* 294: 5'- ATCGGCGAGCCGGTCGACGA -3'

Primer R (Reverse)

- *atpD*771: 5'-GCCGACACTTCCGAACCNGCCTG-3'

Para cada amostra adicionaram-se os seguintes volumes de cada um dos reagentes:

Kit-Taq-Mix Qiagen	15,8 µl
Taq polimerase	2,5 U
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPs	200 µM
Primer F (Stabvida - 10 pmol/µl)	0,5 µl
Primer R (Stabvida - 10 pmol/µl)	0,5 µl
H ₂ O Milli-Q	2,2 µl
DNA (~20 ng/µl)	1 µl

Utilizaram-se as seguintes condições no termociclador (Gaunt *et al.*, 2001):

Desnaturação inicial	95 °C, 5 min	1 ciclo
Desnaturação	95 °C, 45 seg	
Emparelhamento	58 °C, 1 min	35 ciclos
Extensão	72 °C, 1 min 30seg	

Para os genes *recA* e *atpD*, foi necessário para certos isolados o desenho de um a dois pares de *primers* para flanquear a zona de interesse. Para tal, foram pesquisadas sequências relativas ao gene em questão no *NCBI (National Center for Biotechnology Information)*, e que pertencessem ao mesmo género de bactérias alvo. Fez-se os alinhamentos recorrendo ao *software* da *Seqman* da *DNASTar*. Seguidamente, tendo como molde a sequência consenso, escolheram-se as zonas mais conservadas que delimitassem a zona de interesse e que, após análise no programa *Oligocalc* e *Multiple primer analyzer* da *Northwestern University* e *Thermoscientific*, respetivamente, contivessem o mínimo de formação de dímeros, *Hairpins* (estrutura formada devido ao emparelhamento intramolecular) e que possuísssem uma temperatura de *melting* (TM) entre 55°C e 65°C, temperatura esta, que limita a ligação dos *primers* à cadeia de DNA alvo e que influencia a especificidade da ligação (quanto mais alta mais específica). A temperatura ótima de emparelhamento dos *primers* geralmente é 5 °C abaixo da TM. Após a análise e escolha de

um par de *primers* com uma TM similar e com o respetivo *primer Reverse*, transformado na direção reversa, e em complementar face à sequência diretamente obtida do alinhamento anterior, testou-se a capacidade de amplificação *in silico* com o programa *PCR products* da *Bioinformatics*. Utilizou-se a sequência consenso do alinhamento anterior como molde para o teste de *primers*. As sequências desenhadas foram as seguintes:

- *recA74 (Forward)*: 5` - TTAGGTGATACTGCCRTBGARCC - 3´
- *recA585 (Reverse)*: 5` - GGGTTWCCGAACATTACRCCRATT - 3´
- *atpD33(Forward)*: 5` - CGTGTTTCGTRCHATTGCBATGGAY - 3´
- *atpD11(Forward)*: 5` - GACCCTGGAAGTTCAGCAGCAGC - 3´
- *atpD740(Reverse)*: 5` - CGGATACTTCRGRACCTGCYTG - 3´
- *atpD710(Reverse)*: 5` - GGCATACGGCCCAGCAGTGC - 3´

3.3.4.2.1 *glnII*

Foi amplificado o gene *glnII*, que codifica a proteína glutamina sintetase, essencial no metabolismo da fixação do azoto. Espera-se a amplificação de fragmentos de 600 pb de tamanho, correspondendo a uma zona parcial deste gene. Segundo Stepkowski *et al.* (2005), os *primers* utilizados correspondem às seguintes sequências:

- *glnII_f (Forward)*: 5` - SGAGCCGTTCCAGTCGGTGT - 3´
- *glnII_r (Reverse)*: 5` - AAGCTCGAGTACATCTGGCT - 3´.

Para cada amostra adicionaram-se os seguintes volumes de cada um dos reagentes:

Kit-Taq-Mix Qiagen	15,8 µl
Taq polimerase	2,5 U
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPs	200 µM
Primer <i>glnII_f</i> (StabVida - 10 pmol/µl)	0,25 µl
Primer <i>glnII_r</i> (StabVida - 10 pmol/µl)	0,25 µl
H ₂ O Milli-Q	2,7 µl
DNA (~20 ng/µl)	1 µl

Utilizaram-se as seguintes condições no termociclador (Stepkowski *et al.*, 2005):

Desnaturação inicial	95 °C, 2 min	1 ciclo
Desnaturação	95 °C, 45 seg	35 ciclos
Emparelhamento	58 °C, 30 seg	
Extensão	72°C, 1 min 30 seg	
Extensão final	72 °C, 7 min	1 ciclo

3.3.4.3 Genes simbióticos

3.3.4.3.1 *nodC*

Amplificou-se o gene simbiótico *nodC*, que codifica a enzima N-acetil-D-glicosamina transferase, que está incluída nos primeiros passos da construção da estrutura base dos fatores *nod*. Utilizaram-se os seguintes *primers* (Laguerre *et al.*, 2001):

Primer F (Forward)

- NODCFn: 5'-AGGTGGT(Y)GAYGACGGTTC-3'
- NODCF4: 5'-A(Y)GT(H)GT(Y)GA(Y)GACGGATC-3'
- NODCF2: 5'-A(Y)GT(H)GT(Y)GA(Y)GACGGCT-3'
- NODCFu: 5'-A(Y)GTHGTYGAYGACGG(I)TC-3'

Primer R (Reverse)

- NODCI: 5'-A(Y)GT(H)GT(Y)GA(Y)GACGGTTC -3'

Os fragmentos esperados correspondem a parte do *nodC* e são de aproximadamente 900 pb. As reações de PCR foram realizadas para um volume total de 20 µl e a mistura da reação continha:

Kit-Taq-Mix Qiagen	15,8 µl
Taq polimerase	2,5 U
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPs	200 µM

Primer F (Stabvida - 10 pmol/μl)	0,5 μl
Primer R (Stabvida - 10pmol/μl)	0,5 μl
H ₂ O Milli-Q	2,2 μl
DNA (~20 ng/μl)	1 μl

As reações de PCR foram realizadas com as seguintes condições no termociclador (Laguerre *et al.*, 2001):

Desnaturação inicial	95 °C, 3 min	1 ciclo
Desnaturação	94 °C, 1 min	35 ciclos
Emparelhamento	57 °C, 1 min	
Extensão	72 °C, 2 min	
Extensão final	72 °C, 7 min	1 ciclo

3.3.4.3.2 *nifH*

O gene *nifH*, que se agrupa nos genes *nif*, responsáveis por codificar a enzima nitrogenase, foi amplificado. É prevista a amplificação de fragmentos correspondentes a parte deste gene, com 800 pb de tamanho. Segundo Laguerre *et al.* (2001), os *primers* utilizados foram os seguintes:

- NifHF (*Forward*): 5` - TCAGG(N)AA(R)GG(S)GG(N)ATCGGCAA - 3´
- NifHI (*Reverse*): 5` - AGCATGTC(Y)TC(S)AG(Y)TC(N)TCCA - 3´

As reações de PCR foram realizadas para um volume total de 20 μl e a mistura da reação continha:

Kit-Taq-Mix Qiagen	15,8 μl
Taq polimerase	2,5 U
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPs	200 μM
Primer NifHF (Stabvida - 10 pmol/μl)	1 μl

Primer NifHI (Stabvida - 10 pmol/ μ l)	1 μ l
H ₂ O Milli-Q	1,2 μ l
DNA (~20 ng/ μ l)	1 μ l

As condições no termociclador foram as seguintes (Laguerre *et al.*, 2001):

Desnaturação inicial	95 °C, 3 min	1 ciclo
Desnaturação	94 °C, 1 min	35 ciclos
Emparelhamento	57 °C, 1 min	
Extensão	72 °C, 2 min	
Extensão final	72 °C, 7 min	1 ciclo

3.4 Extração de fragmentos de DNA da agarose

Para posterior sequenciação dos fragmentos de DNA amplificados pelas diversas reações de PCR e após a verificação da amplificação da banda esperada na eletroforese em gel de agarose, procedeu-se à sua extração através do *kit* da *Qiagen* (*QIAEXII 2008, DNA fragments extraction from Agarose Gels*). De acordo com as especificações do protocolo do respetivo *kit*, procedeu-se do modo especificado no Anexo III.

3.5 Sequenciação de fragmentos de DNA e construção de árvores filogenéticas

As amostras foram sequenciadas pelo método de “Chain termination” por Sanger *et al.* (1977). Segundo este método, a amostra é dividida em quatro reações que ocorrem separadas, cada uma destas contendo um dos dideoxinucleótidos (ddNTP's) que não contêm 3'-OH necessário à formação da ligação de fosfato, terminando a reação. Assim, resultam múltiplos fragmentos que são depois desnaturados pelo calor e separados pelo tamanho em gel submetido a eletroforese, sendo que cada linha só contempla um tipo de nucleótido. As bandas de DNA são depois visualizadas em autoradiografia ou luz UV. A

posição relativa das diferentes bandas nas quatro linhas é utilizada para reconstruir a sequência de DNA (Kumar, 2012).

As amostras quando purificadas do gel de agarose foram sequenciadas na *Estación Experimental del Zaidin* (EEZ) e no Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (IPBLN). Para cada amostra, utilizou-se um microtubo de 0,5 ml, e adicionou-se para um volume total de 12 µl, 2 ng/µl de DNA a sequenciar e 0,5 pmol/ µl de um dos *primers*, cujo fragmento de DNA tenha sido amplificado.

Alternativamente as amostras foram sequenciadas na empresa STAB-VIDA. Para tal, colocou-se num microtubo, o fragmento de DNA a sequenciar numa concentração igual ou superior a 10 ng/µl e noutro microtubo, colocou-se 5 µl de *primer* (*Reverse* ou *Forward*) com uma concentração de 10 pmol/µl.

As sequências foram analisadas criteriosamente com o programa *Chromas*, que permite visualizar o cromatograma das sequências, onde se analisou a qualidade e o tamanho (pb) das sequências. As sequências foram editadas manualmente neste programa, sempre que possível, ou então novamente sequenciadas.

Pesquisaram-se sequências homólogas na base de dados *Blastn* do *NCBI*. No *Blastn* foi utilizada a *Nucleotide collection* (nr/nt) e otimizou-se para sequências altamente similares (*megaBlast*). Ordenaram-se as sequências de acordo com o menor *E-value*, número que traduz a taxa de alinhamentos falsos positivos. Selecionaram-se as sequências mais homólogas e juntamente com as espécies tipo representativas, construíram-se as árvores filogenéticas com recurso ao programa *Mega*. Após alinhamento das sequências com *Clustalw*, para a construção das árvores filogenéticas, recorreu-se à análise estatística segundo *neighbor-joining*. As distâncias foram calculadas de acordo com método *p distance* e a opção “*pairwise deletion*”. Selecionou-se um *bootstrap* de 1000 replicações.

3.6 Ensaio de inoculação mista

Estes ensaios foram realizados, utilizando-se como planta hospedeira *L. uliginosus* cv. Sunrise, com vista a tentar explicar o aparecimento de certos isolados nos nódulos de *L. parviflorus*, que após terem sido isolados dos nódulos radiculares foram incapazes de voltar a nodular a mesma espécie.

A esterilização e a germinação das sementes de *L. uliginosus* foram efetuadas de modo igual ao indicado na secção 3.2.1 e 3.2.2. Os ensaios de nodulação correram conforme o descrito anteriormente: as plântulas de *L. uliginosus* pré-germinadas foram transferidas, em condições assépticas, para frascos com meio de Jensen inclinado e cobertos por papel celofane com uma abertura preenchida por algodão. Para estes ensaios o isolado Lp11 (de crescimento lento) foi utilizado sempre nos inóculos mistos e também 7 isolados de *L. parviflorus*, designadamente: Lp5a, Lp5b, Lp6, Lp7b, Lp8, Lp9 e Lp13a. Cada um destes isolados foi utilizado em inóculos singulares e em mistura com o isolado Lp11 (Tabela 1), contendo cada um aproximadamente 10^8 células de cultura bacteriana, previamente crescidas em meio AML e ressuspendidas em meio Jensen líquido a $\frac{1}{4}$, utilizando 1 ml de cada para inocular as plântulas de *L. uliginosus*.

De forma igual aos ensaios de nodulação descritos anteriormente foram também incluídos um controlo com 1,75 % *p/v* de KNO_3 (TN) e outro apenas com meio de Jensen líquido a $\frac{1}{4}$ (T0). Para cada tratamento efetuaram-se 3 réplicas.

Tabela 1: Resumo dos vários tratamentos efetuados, no ensaio de inoculação mista, utilizando como planta hospedeira *L. uliginosus*.

Inóculos de isolados singulares	Inóculos com mistura de isolados	Controlos
Lp5a	Lp11 + Lp5a	TN
Lp5b	Lp11 + Lp5b	T0
Lp6	Lp11 + Lp6	
Lp7b	Lp11 + Lp7b	
Lp8	Lp11 + Lp8	
Lp9	Lp11 + Lp9	
Lp13a	Lp11 + Lp13a	
Lp11		

As plantas cresceram numa câmara climatizada, com luz e temperatura controladas (fotoperíodo com 16 h de dia e 8 h de noite e temperaturas diurnas de 23 °C e noturnas de 18 °C). As plantas foram “regadas” com 2 ml de meio de Jensen líquido a $\frac{1}{4}$ a cada duas semanas. O ensaio teve uma duração de 8 semanas, ao fim do qual se analisou o aparecimento de nódulos e calculou-se a eficácia da simbiose, recorrendo aos pesos secos da parte aérea. De forma igual aos ensaios de nodulação anteriores, calculou-se a eficácia da simbiose de acordo com Ferreira & Marques (1992).

3.6.1 Esterilização dos nódulos

No final do ensaio, 50 % dos nódulos de cada tratamento foram retirados e esterilizados superficialmente. Para tal, após retirar os vários nódulos da planta, procedeu-se à sua imersão em álcool (98 %), com agitação, durante 1 min, seguida de lavagem com H₂O_d esterilizada e depois imersão em HgCl₂ (0,1 %), com agitação, durante 2 min. Por fim, efetuaram-se seis lavagens sucessivas com H₂O_d, de modo retirar o HgCl₂ (Somasegaran & Hoben, 1994).

3.6.2 Isolamento e caracterização das bactérias

Após a esterilização, os nódulos foram esmagados e o seu conteúdo cultivado em meio AML com VC e em AML com BTB, por riscado de exaustão. Designou-se os isolados dos nódulos provenientes de inoculação mista com a mesma abreviatura de *L. parviflorus* “Lp” e com os números dos dois isolados da mistura de inoculação, seguido do número do isolamento em letra romana. Por exemplo, o isolamento do primeiro nódulo proveniente da mistura de Lp11 e Lp5a, designou-se por Lp11-5a I.

As placas foram colocadas na estufa, a 27°C, durante 10 dias e consideraram-se os seguintes parâmetros: diferentes velocidades de crescimento, diferentes tipos de absorção do VC e diferentes morfologias das colónias. De seguida, de acordo com os parâmetros analisados face ao isolado Lp11, escolheram-se 3 colónias por cada tratamento diferente.

Extraiu-se o DNA genómico com o *kit* da *Bio-Rad* (Anexo II), efetuou-se a amplificação por ERIC-PCR (de modo semelhante ao efetuado na secção 3.3.3.1), amplificou-se parte do gene *recA* (como indicado na secção 3.3.4.2.1) de um dos 3 isolados escolhidos anteriormente e sequenciou-se este gene na empresa STAB-VIDA. As

sequências foram depois comparadas com as dos isolados constituintes da respetiva mistura de inoculação.

3.7 Outras atividades promotoras do crescimento vegetal

3.7.1 Solubilização do fosfato inorgânico

A detecção de solubilizadores de fosfato foi efetuada crescendo os vários isolados a 27°C, no escuro em meio YED com a adição de 2×10^{-5} % *p/v* de Ca_3PO_4 . O aparecimento de um halo transparente em redor das colónias foi considerado como resultado positivo, indicativo da solubilização de fosfato inorgânico (Illmer *et al.*, 1995).

3.7.2 Quelatação do ferro extracelular

A quelatação do ferro extracelular, pela presença de moléculas designadas por sideróforos, foi determinada através do crescimento dos diferentes isolados em meio TY, incubados a 27°C, no escuro. Após o crescimento, cada placa foi preenchida com meio CAS (15 ml) a 50 °C, e a sua observação efetuada após 12 h. O aparecimento de halos, laranjas ou roxos, foram considerados como resultado positivo (Pérez-Miranda *et al.*, 2007).

3.7.3 Hidrólise da celulose e pectina

Para a determinação da capacidade de degradar a celulose e a pectina, que são polissacáridos estruturais da parede celular das plantas, os isolados cresceram em meio TY com 0,2 % *p/v* de carboximetilcelulose e em meio TY com 0,5 % *p/v* de pectina, respectivamente. No caso do teste da celulase, após crescimento dos isolados, adicionou-se de 1 mg/ml de VC a cada placa, esperou-se 30 min e em seguida as placas foram lavadas com uma solução 1 M de NaCl. No teste da pectinase, após crescimento, adicionou-se à placa 15 µl de Brometo de Cetil Trimetil Amónia (CTAB) a 2 %. A presença das enzimas celulase e pectinase, foi determinada pelo aparecimento de um halo (transparente no caso

da pectinase e laranja no caso da celulase), revelador da ação destas enzimas e da degradação do respectivo substrato (Verma *et al.*, 2001).

3.7.4 Antagonismo a agentes fitopatogénicos

O micélio das culturas de *Phytophthora cinnamomi* e de *Botryosphaeria corticola*, crescidas em placas com meio PDA, a 27°C e no escuro, foram utilizadas para inocular placas contendo meio AML. Para isso, foi colocado um disco de micélio no centro de cada placa e incubado a 27°C durante 48 h. Após este período, inocularam-se os diferentes isolados bacterianos na periferia da placa. Incubaram-se as placas na estufa a 27°C, no escuro, durante aproximadamente 10 dias. Os resultados foram considerados positivos quando os isolados inibiram o crescimento dos respetivos patogénios.

4. Resultados e discussão

4.1 Coleção bacteriana isolada e características do crescimento

A coleção bacteriana utilizada neste estudo compreendeu: 13 estirpes isoladas dos nódulos radiculares de plantas de *L. parviflorus* (designadas por Lp) e 9 estirpes isoladas dos nódulos radiculares de plantas de *L. uliginosus* (designadas por Lu). Estas estirpes foram caracterizadas morfológicamente quanto ao grau de absorção do vermelho de congo e quanto ao tipo de reação em azul de bromotimol.

De acordo com Somasegaran & Hoben, (1994), seria esperado encontrar estirpes que não absorvessem vermelho de congo (VC), quando crescidas em meio AML com VC. Contudo, verificou-se que algumas estirpes, designadamente: Lp7a, Lp7b, Lp10 e Lp13a, absorveram consideravelmente este corante (Tabela 2). Os isolados de *L. uliginosus*, por sua vez, quando cresceram em AML com VC, mostraram-se mais homogêneos, e apenas o isolado Lu13 absorveu este corante (Tabela 3).

Nos isolados de *L. parviflorus*, foi também encontrada bastante heterogeneidade quanto ao tipo de reação em azul de bromotimol e velocidade de crescimento. Verificou-se que os isolados Lp5a, Lp6, Lp8, Lp9, Lp12, Lp13b e Lp14, quando crescidos em meio AML com BTB, possuíram um crescimento rápido (2 - 3 dias), acidificando o meio de cultura e mudando-o assim de cor para amarelo (Tabela 2). Por outro lado, os isolados Lp7a, Lp7b, Lp11 e Lp13a possuíram um crescimento lento, alcalinizando o meio de cultura e mudando-o de cor para azul (Tabela 2). Entre estes, o isolado Lp11 foi o de crescimento mais lento, demorando 6 - 7 dias a crescer em placa, enquanto os restantes isolados demoram apenas 4 dias. Verificou-se ainda a existência de 2 isolados, Lp5b e Lp10, que após crescimento obtiveram uma cor transitória, isto é, entre o verde (cor correspondente a pH=7) e o amarelo (correspondente a pH<7) e que se denominou de crescimento intermédio (3 - 4 dias) (Tabela 2).

Em relação aos isolados de *L. uliginosus*, quando crescidos em meio AML com BTB, verificou-se que apenas o isolado Lu13, foi de crescimento rápido, revelando-se, deste modo, bastante atípico em relação aos restantes isolados de *L. uliginosus*, que possuíram crescimento lento e alcalinizaram o meio de cultura (Tabela 3).

Tabela 2: Absorção de vermelho de congo (VC) e reação em azul de bromotimol/velocidade de crescimento dos isolados de *L. parviflorus*.


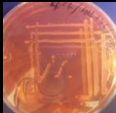
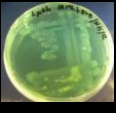


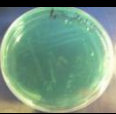
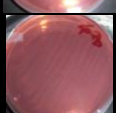


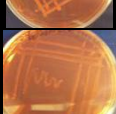
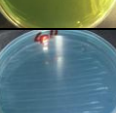
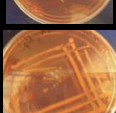

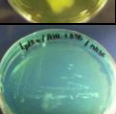
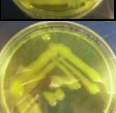














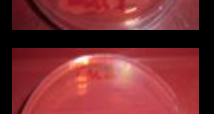

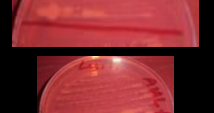

	Absorção de VC em AML		Reação em AML com BTB /velocidade de crescimento	
Lp5a	Não absorve (-)		Ácida/Rápido	
Lp5b	-		Neutra/Intermédio	
Lp6	-		Ácida/Rápido	
Lp7a	Absorve (+)		Alcalina/Lento	
Lp7b	+		Alcalina/Lento	
Lp8	-		Ácida/Rápido	
Lp9	-		Ácida/Rápido	
Lp10	+		Neutra/Intermédio	
Lp11	-		Alcalina/Lento	
Lp12	-		Ácida/Rápido	
Lp13a	+		Alcalina/Lento	
Lp13b	-		Ácida/Rápido	
Lp14	-		Ácida/Rápido	

Tabela 3: Absorção de vermelho de congo (VC) e reação em azul de bromotimol/velocidade de crescimento dos isolados de *L. uliginosus*.

	Absorção de VC		Reação em AML com BTB / velocidade de crescimento	
Lu1	Não absorve (-)		Alcalina/Lento	
Lu2	-		Alcalina/Lento	
Lu4	-		Alcalina/Lento	
Lu8	-		Alcalina/Lento	
Lu13	Absorve (+)		Ácida/Rápido	
Lu16	-		Alcalina/Lento	
Lu17	-		Alcalina/Lento	
Lu20	-		Alcalina/Lento	
Lu35	-		Alcalina/Lento	

4.2 Ensaio de nodulação

Dos 13 isolados de *L. parviflorus*, apenas Lp11 revelou capacidade para nodular plantas do género *Lotus* (Figura 5).

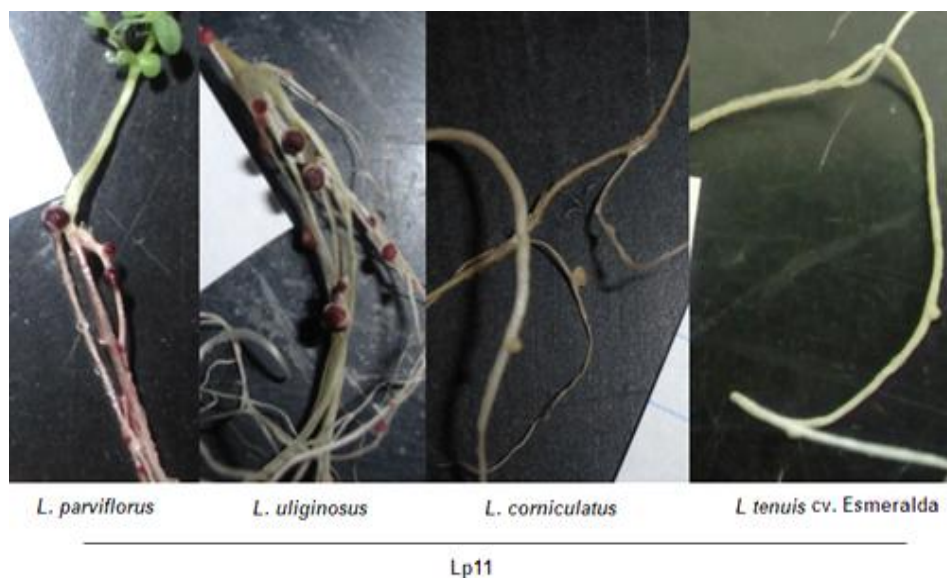


Figura 5: Exemplo representativo de nódulos formados pelo isolado Lp11 nas várias espécies de plantas hospedeiras de *Lotus* testadas.

Os restantes doze isolados não foram capazes de nodular as espécies de *Lotus* testadas, incluindo a de *L. parviflorus* (Tabela 4). Estes isolados, provavelmente coexistiam nos nódulos com outras estirpes que tinham a capacidade para nodular e entraram juntamente com estas durante a génese dos nódulos. Este mecanismo ficou bem demonstrado recentemente, com recurso ao microscópio confocal, em que se observou a entrada de bactérias endófitas em nódulos de plantas do género *Vigna* (Pandya *et al.*, 2013). Deste modo, no caso do presente estudo, poderá pôr-se a hipótese de que as estirpes responsáveis pela nodulação, durante o isolamento, tenham sido inibidas por estirpes de crescimento mais rápido ou ainda por não serem cultiváveis. Muresu *et al.* (2008), através da aplicação de 16S rRNA-PCR diretamente sobre o produto esmagado dos nódulos e em comparação com o 16S rRNA-PCR do mesmo produto, mas cultivado, concluiu, ao estudar plantas silvestres de três tribos de leguminosas, incluindo a tribo *Loteae*, que o fenómeno da existência de rizóbios não cultiváveis, e por conseguinte o isolamento apenas de estirpes não sendo rizóbio, é comum em plantas silvestres. Como estas, tem-se o exemplo de *L. parviflorus*, estudada no presente trabalho, que não possui, até à data, interesse agrícola, não é cultivada, nem possui inóculos comerciais (que são cultiváveis), como por exemplo, *Bradyrhizobium* sp. NZP2309, no caso de *L. uliginosus*.

Tabela 4: Resultado dos ensaios de nodulação efetuados com várias plantas hospedeiras do género *Lotus*, inoculadas com os isolados de *L. parviflorus* e de *L. uliginosus*.

		Fenótipo de nodulação				
		Lc	Lt P	Lu	Lt E	Lp
Isolados de <i>L. parviflorus</i>	Lp5a, Lp5b, Lp6, Lp7a, Lp7b, Lp8, Lp9, Lp10, Lp12, Lp13a, Lp13b, Lp14	Nod ⁻	Nod ⁻	Nod ⁻	Nod ⁻	Nod ⁻
	Lp11	Fix ⁻	Nod ⁻	Fix ⁺	Fix ⁻	Fix ⁺
Isolados de <i>L. uliginosus</i>	Lu1, Lu2, Lu4, Lu8, Lu16, Lu17, Lu20, Lu35	Fix ⁻	Fix ⁻	Fix ⁺	Fix ⁻	Fix ⁺
	Lu13	Nod ⁻	Nod ⁻	Nod ⁻	Nod ⁻	Nod ⁻

Nod⁻: Isolado que não nodula. Fix⁻: isolado que nodula mas que não fixa azoto. Fix⁺ isolado que nodula e fixa azoto. Lc: *Lotus corniculatus* cv. S. Gabriel; Lt P: *Lotus tenuis* cv. Pampa INTA; Lt E: *Lotus tenuis* cv. Esmeralda; Lu: *Lotus uliginosus* cv. Sunrise; Lp: *Lotus parviflorus*.

Apesar de muitas vezes se eliminarem as estirpes que não nodulam, consideradas como “contaminantes”, tem sido referido em alguns estudos, a sua coexistência com o rizóbio nos nódulos, onde se têm inclusivamente isolado, bactérias Gram positivas (de Lajudie *et al.*, 1999; Philipson & Blair, 1957). Algumas destas estipes, adotaram estratégias diferentes às do mutualismo, como por exemplo, o parasitismo (Denison & Kiers, 2004; Friesen & Mathias, 2010). Esta estratégia foi bem evidenciada, no presente trabalho, pelo isolado Lp13b em *L. tenuis* cv. Pampa INTA, pela formação de tumores na raiz (Figura 6) e pelo isolado Lp5a que provocou zonas de necrose em *L. tenuis* e *L. corniculatus* (Figura 7).



Figura 6: Tumor formado pelo isolado Lp13b em plantas de *L. tenuis* cv. Pampa INTA.

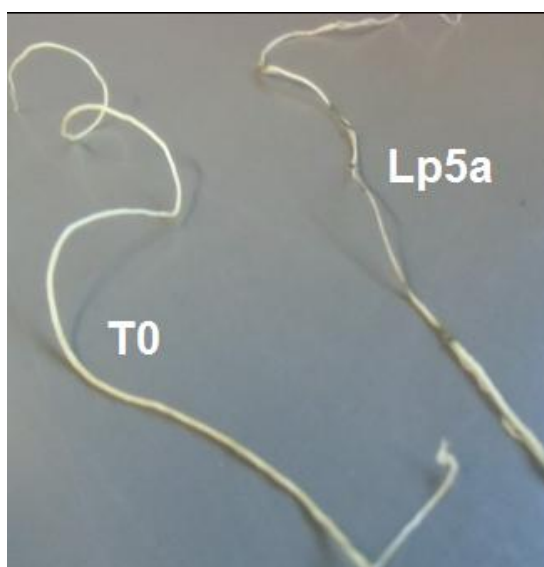


Figura 7: Zonas da raiz com necrose de tecidos provocadas pelo isolado Lp5a (à direita) em comparação com a raiz do controle T0 (à esquerda), em plantas de *L. corniculatus*.

Relativamente aos isolados de *L. uliginosus* verificou-se que, à exceção do isolado Lu13, foram capazes de nodular as várias espécies de *Lotus* testadas (Tabela 4; Figura 8). De igual modo, ao discutido anteriormente para os isolados de *L. parviflorus*, o isolado Lu13 poderá ter surgido, no respetivo nódulo, por um mecanismo similar.



Figura 8: Exemplo representativo de nódulos formados por alguns dos isolados de *L. uliginosus* nas várias plantas de *Lotus* hospedeiras.

A determinação do peso seco da parte aérea das plantas de *Lotus*, inoculadas com os isolados de *L. parviflorus* e *L. uliginosus*, permitiu avaliar a capacidade de fixação de azoto destas bactérias, quando em simbiose com as respectivas plantas hospedeiras. Assim, para o caso dos isolados de *L. parviflorus*, o isolado Lp11, que foi o único a nodular *Lotus* spp., formou nódulos eficazes em *L. parviflorus* e *L. uliginosus*, com 55 % e 11 % de eficácia simbiótica relativa, respetivamente. Este isolado nodulou também, mas ineficazmente, *L. corniculatus*, onde inclusivamente originou uma diminuição do crescimento vegetal (Figura 11), e *L. tenuis* cv. Esmeralda (Tabela 4).

Além do isolado Lp11, destacam-se também os isolados Lp7a e Lp7b, que apesar de não produzirem nódulos, aumentaram consideravelmente o peso seco em todas as plantas testadas, à exceção de *L. corniculatus* (Figuras 9, 10, 11, 12 e 13). Em *L. parviflorus* os isolados Lp10 e Lp5b também obtiveram um peso seco bastante acima do controlo T0 (Figura 9). Estes isolados que não nodulam, mas promovem o crescimento vegetal, poderão fazê-lo através de outra via para além da fixação de azoto, como a produção de fitohormonas. Ou então pela mesma via, mas sem se associarem endossimbioticamente com a planta em questão. Os restantes isolados não produziram um aumento do peso seco significativo em nenhuma das plantas testadas, tendo inclusivamente na maioria dos casos produzido uma diminuição no peso seco.

Em relação aos isolados de *L. uliginosus*, de um modo geral, os valores mais elevados de peso seco foram obtidos quando se inocularam as plantas de *L. parviflorus* e de *L. uliginosus* (Figuras 9 e 10). Para estas plantas hospedeiras, as eficácias simbióticas variaram entre 10 a 23 % para *L. parviflorus* e entre 32 % a 50 % para *L. uliginosus*, à exceção do isolado Lu2. Os valores mais baixos de peso seco foram obtidos com *L.*

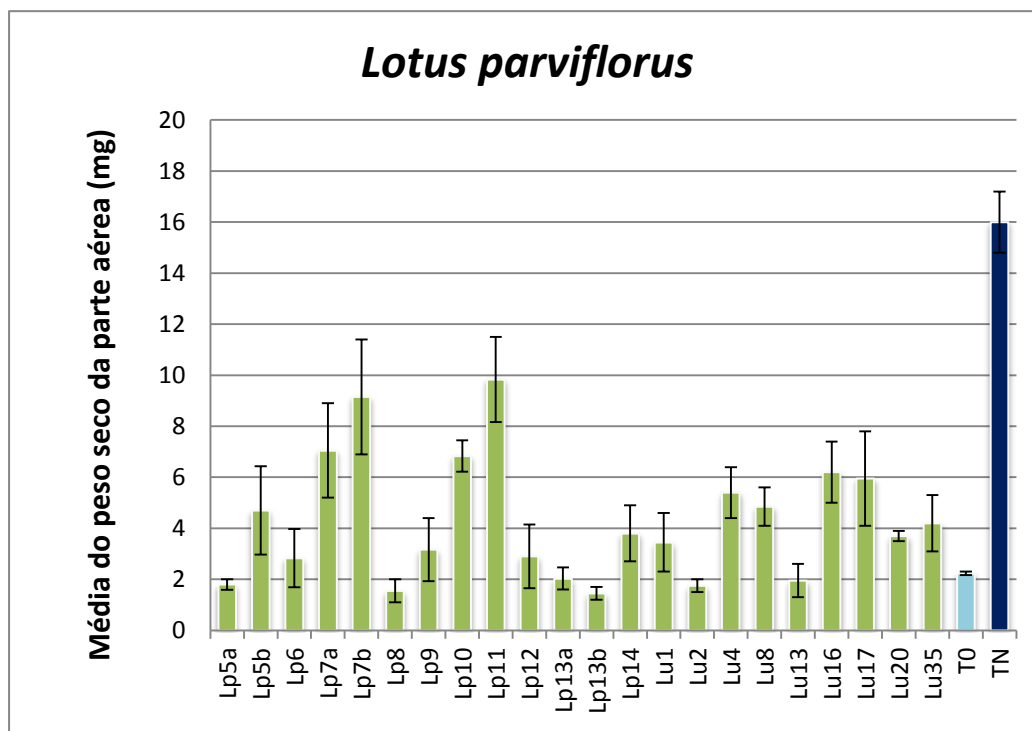


Figura 9: Média dos pesos secos dos isolados de *L. parviflorus* e de *L. uliginosus*, e respectivos controlos em *L. parviflorus* (planta hospedeira). A linha de intervalo a preto no topo das barras corresponde ao erro padrão. Os valores representados neste gráfico pelas barras estão descritos no Anexo IV: Tabela 12.

corniculatus, em que apenas o isolado Lu4, obteve valores mais elevados que o controlo T0 (Figura 11). Nas duas cultivares de *L. tenuis* obtiveram-se valores próximos do controlo T0, revelando serem ineficazes, na fixação de azoto, para esta espécie de planta (Figuras 12 e 13).

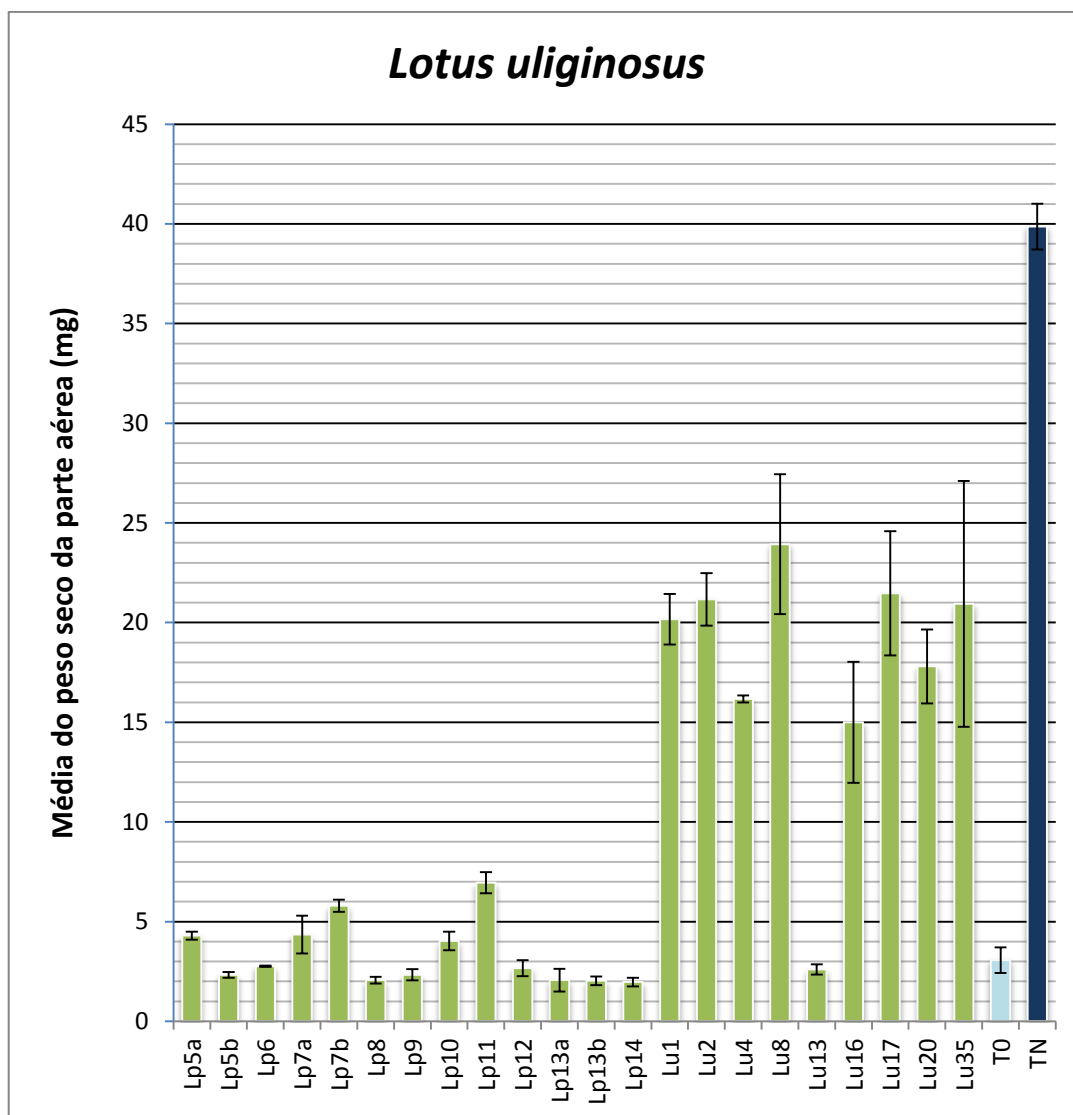


Figura 10: Média dos pesos secos dos isolados de *L. parviflorus* e de *L. uliginosus*, e respectivos controlos em *L. uliginosus* (planta hospedeira). A linha de intervalo a preto no topo das barras corresponde ao erro padrão. Os valores representados neste gráfico pelas barras estão descritos no Anexo IV: Tabela 12.

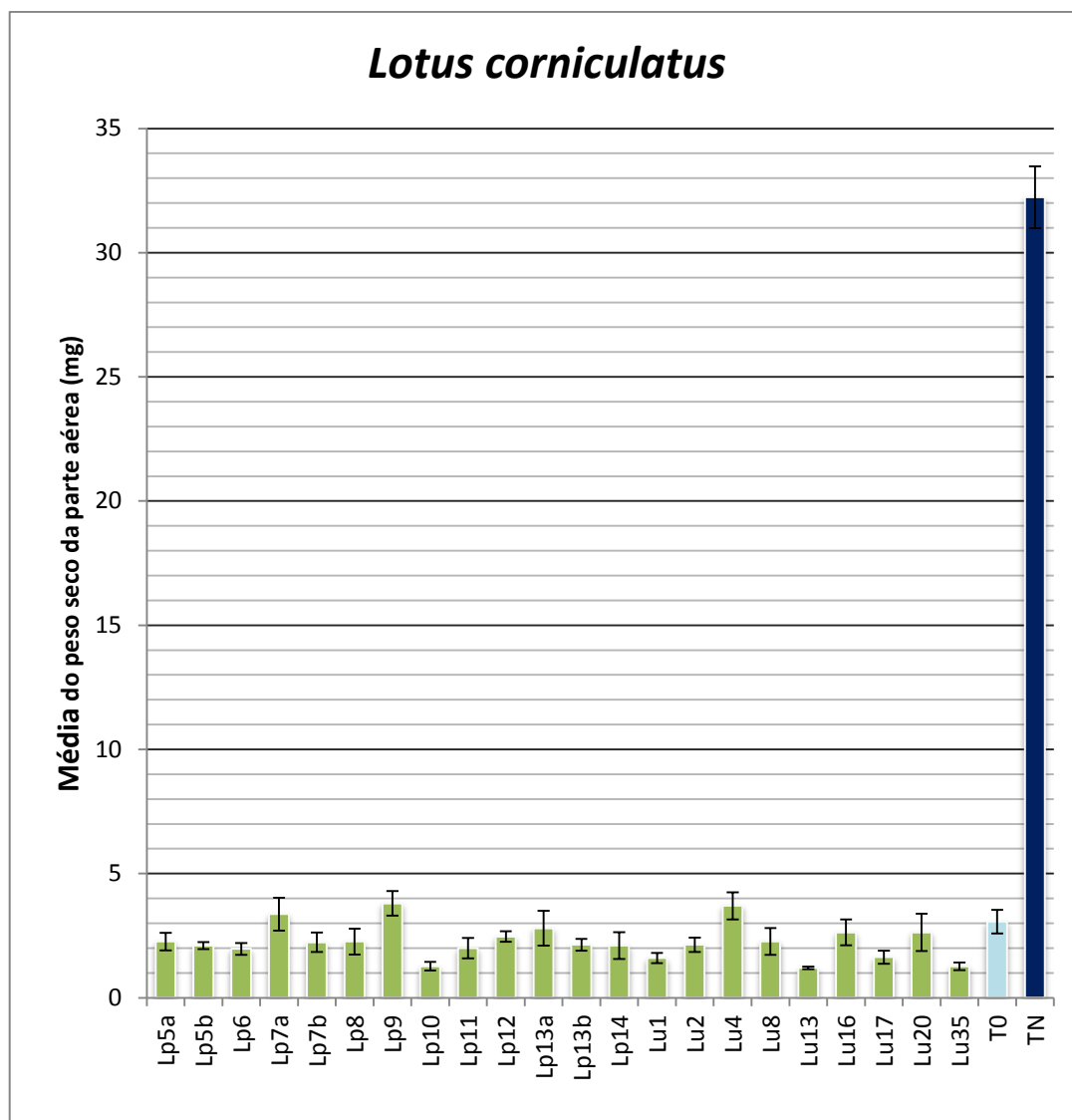


Figura 11: Média dos pesos secos dos respectivos isolados de *L. parviflorus* e de *L. uliginosus*, e respectivos controles em *L. corniculatus* (planta hospedeira). A linha de intervalo a preto no topo das barras corresponde ao erro padrão. Os valores representados neste gráfico pelas barras estão descritos no Anexo IV: Tabela 12.

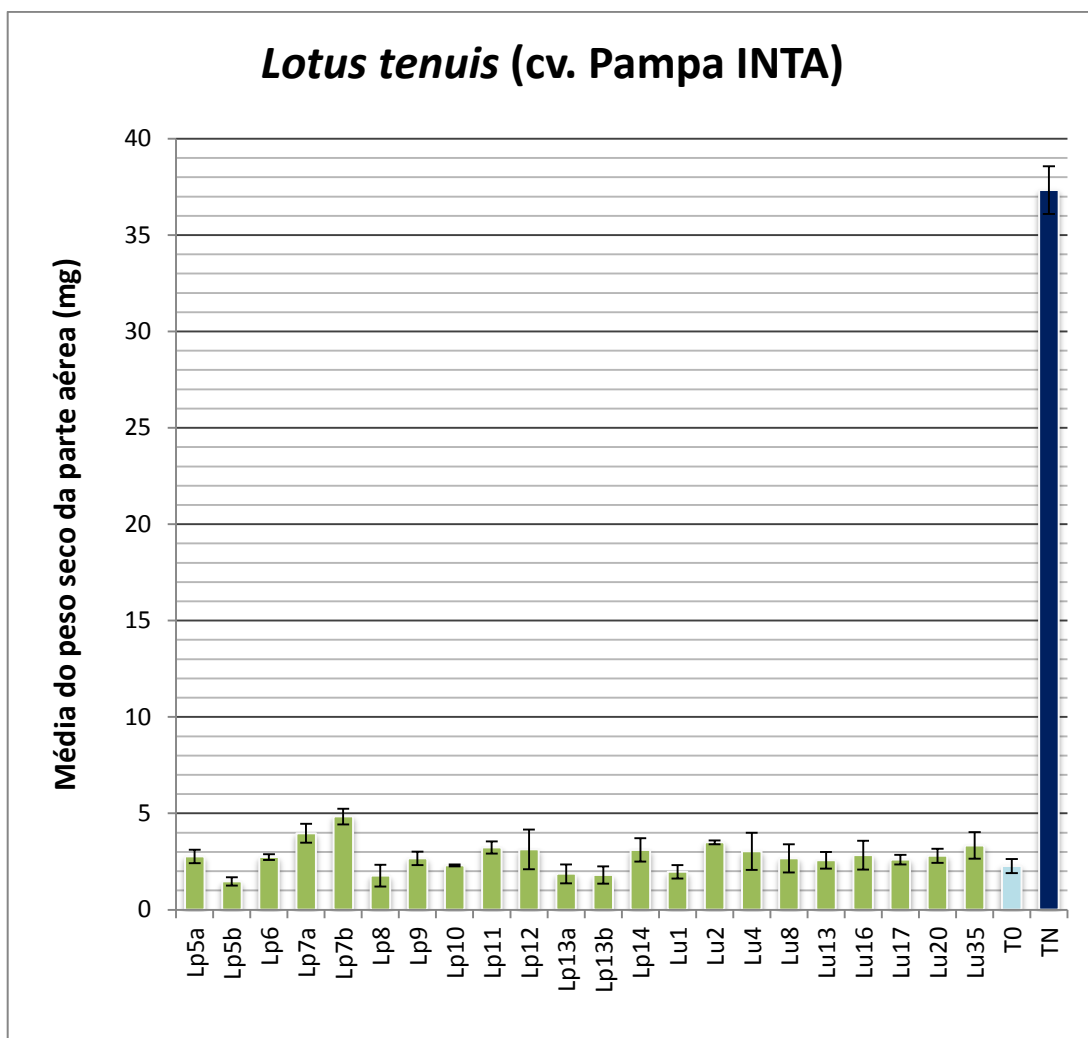


Figura 12: Média dos pesos secos dos respectivos isolados de *L. parviflorus* e de *L. uliginosus*, e respectivos controlos em *L. tenuis* cv. Pampa INTA (planta hospedeira). A linha de intervalo a preto no topo das barras corresponde ao erro padrão. Os valores representados neste gráfico pelas barras estão descritos no Anexo IV: Tabela 12.

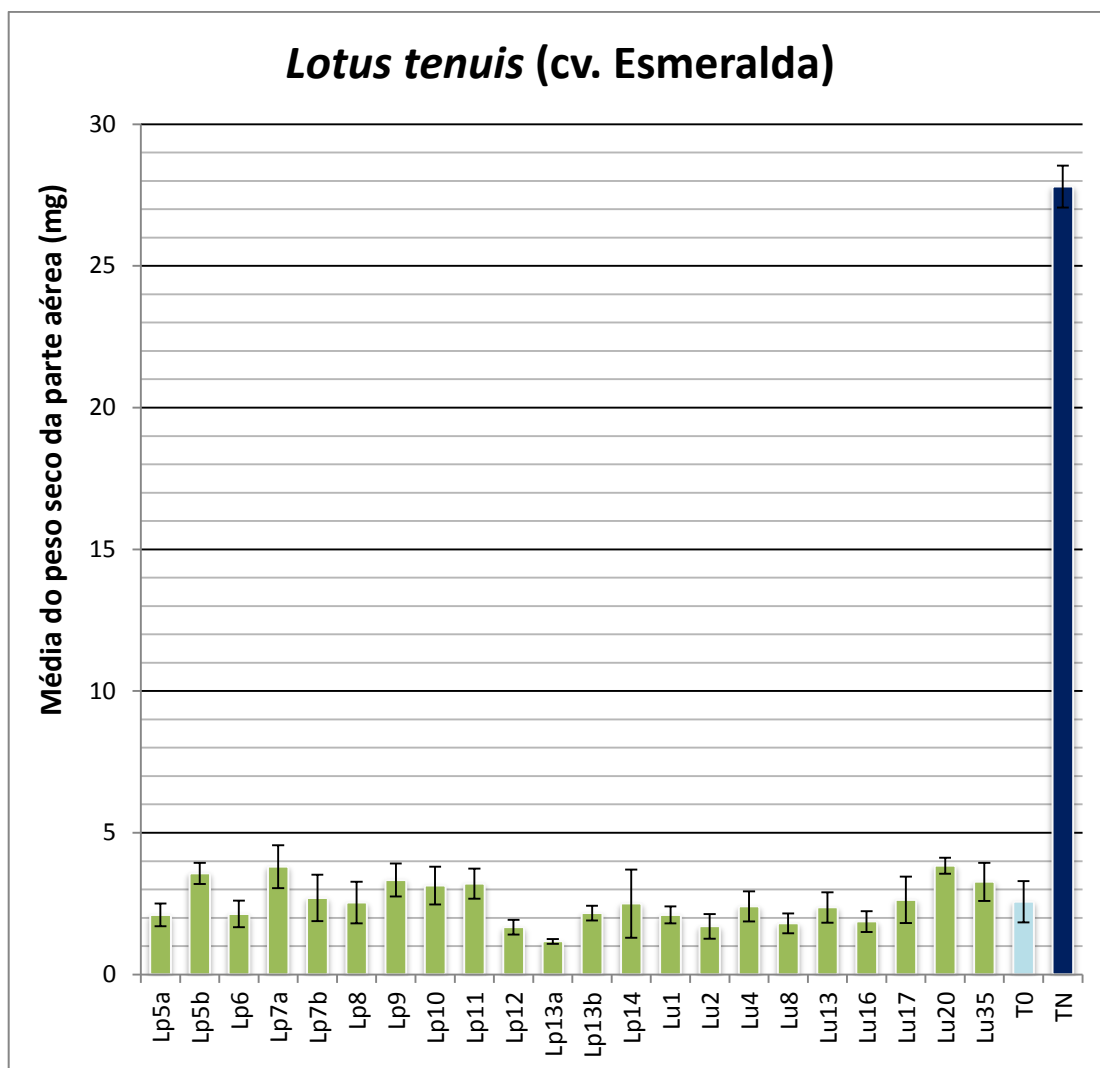


Figura 13: Média dos pesos secos dos isolados de *L. parviflorus* e de *L. uliginosus*, e respectivos controles em *L. tenuis* cv. Esmeralda (planta hospedeira). A linha de intervalo a preto no topo das barras corresponde ao erro padrão. Os valores representados neste gráfico pelas barras estão descritos no Anexo IV: Tabela 12.

4.3 Caraterização molecular

4.3.1 Extração de DNA genómico

O DNA genómico foi extraído com sucesso para todos os isolados em estudo e sem alterações significativas aos protocolos utilizados. Após a extração verificou-se a existência de uma banda de elevado peso molecular (cerca de 23 kb) (Figura 14). Calculou-se a concentração aproximada em relação à concentração conhecida do marcador de pesos moleculares utilizado. Efetuaram-se as várias diluições até se otimizar a concentração pretendida, por tentativa-erro (Figura 15).

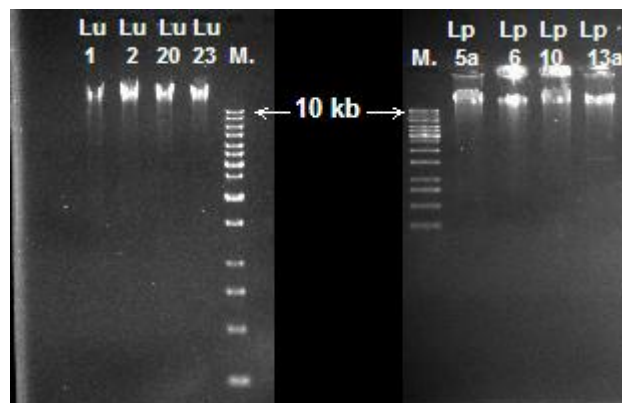


Figura 14: Gel de eletroforese de DNA genômico extraído dos isolados em estudo. M.: marcador de pesos moleculares de 1kb (250 pb – 10000 pb).

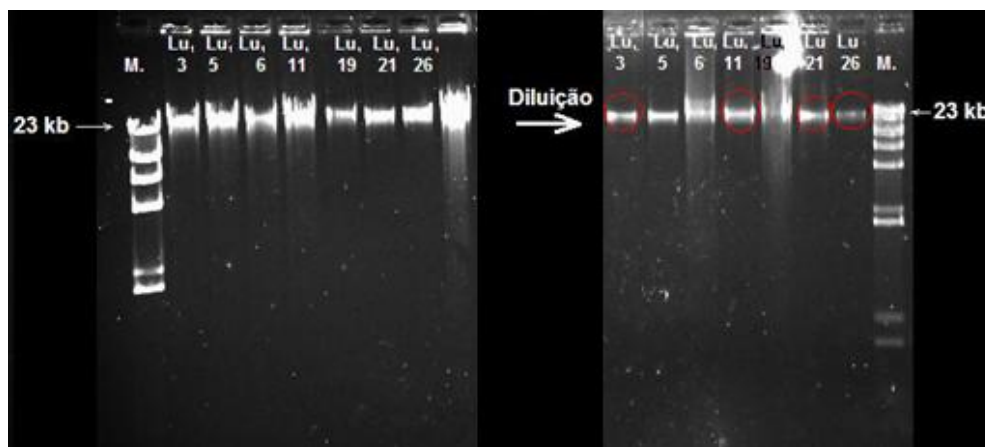


Figura 15: Géis de eletroforese de DNA genômico extraído dos isolados em estudo. O Gel da esquerda corresponde à primeira eletroforese de amostras após extração de DNA. O Gel da direita corresponde a uma eletroforese posterior, com diluição de algumas das amostras do gel da esquerda. M.: marcador de pesos moleculares fago λ digerido com HindII (564 bp - 23130 bp). Amostras assinaladas com um círculo vermelho possuem a concentração desejada: cerca de 20 ng/ μ l.

4.3.2 Diversidade bacteriana

A análise da diversidade genética dos isolados foi efetuada com base em sequências repetitivas e altamente conservadas designadas por sequências ERIC (*Enterobacterial repetitive intergenic consensus*) e REP (*Repetitive element palindromic*). O uso de *primers* para estas zonas, na reação de PCR, conduz a uma amplificação seletiva de regiões genômicas distintas, dando origem a um perfil de amplificação de fragmentos que permitem diferenciar os isolados entre si.

4.3.2.1 ERIC-PCR

Através da análise dos diferentes fragmentos (bandas) gerados após amplificação por ERIC-PCR e visualizados após eletroforese foi possível analisar a diversidade existente entre estes isolados (Figura 16).

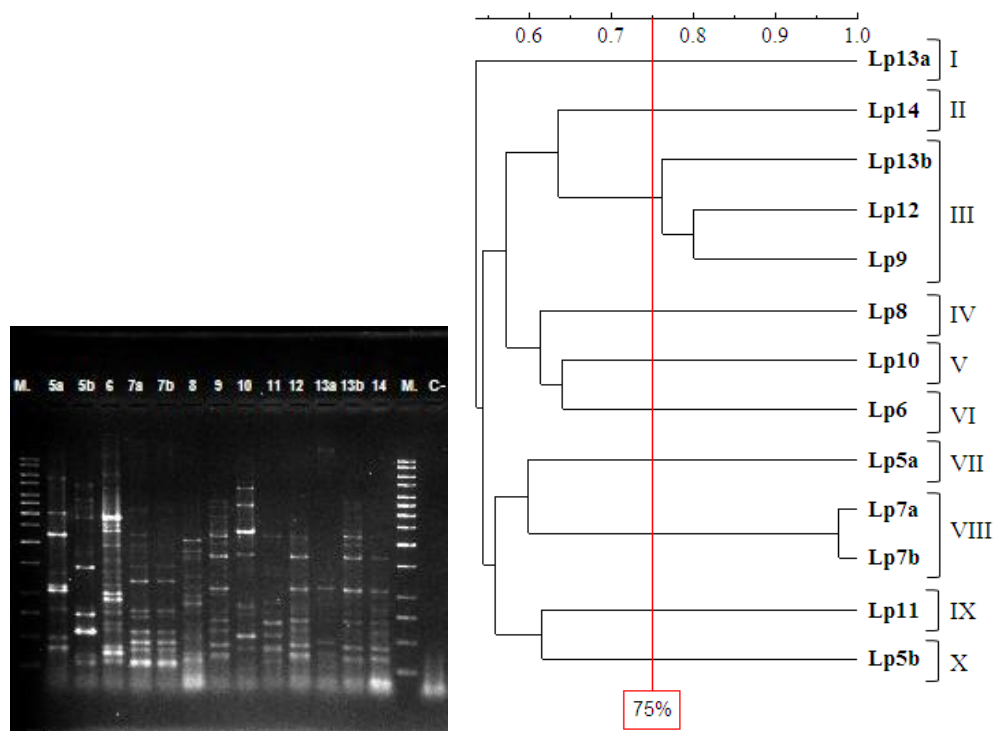


Figura 16: Gel de eletroforese referente aos isolados de *L. parviflorus*, amplificados por ERIC-PCR e respetivo dendograma, onde estão representados os grupos (I-X) obtidos a 75 % semelhança. M.: marcador de pesos moleculares de 1 kb (10000 - 250 pb). C-: controlo negativo (sem DNA).

Através da amplificação por ERIC-PCR dos isolados de *L. parviflorus* resultou uma grande disparidade de perfis. Considerando uma percentagem de semelhança de 75 %, surgem 10 grupos diferentes em apenas 13 isolados. Estes grupos são compostos por I: Lp13a; II: Lp14; III: Lp9, Lp12, Lp13b; IV Lp8; V: Lp10; VI Lp6; VII: Lp5a; VIII: Lp7a e Lp7b; IX: Lp11; X: Lp5b. Apenas um grupo (VIII) possui isolados com uma percentagem de semelhança de quase 100 %, respetivamente, Lp7a e Lp7b, que foram isolados do mesmo nódulo.

4.3.2.2 REP-PCR

A diversidade genética existente entre os isolados de *L. uliginosus* foi estudada através da análise dos diferentes fragmentos gerados após amplificação, por REP-PCR (Figura 17). Foram igualmente incluídas nesta análise estirpes isoladas de *L. uliginosus* previamente descritas em Lorite *et al.* (2012): 3LBC, 6LBC, 7LBC, 9LBC, 5LBI, 8LBI e a estirpe comercial *Bradyrhizobium* sp. NZP 2309.

Analisando o dendograma gerado pela amplificação de bandas por REP-PCR, resultaram 6 grupos distintos a uma percentagem de semelhança de 75 % (Figura 17). Estes grupos são compostos por: I: Lu25 e Lu35; II: Lu3, Lu2, Lu8, Lu1; III: Lu16 e Lu4; IV: Lu17; V: Lu24 e Lu13; VI: Lu20.

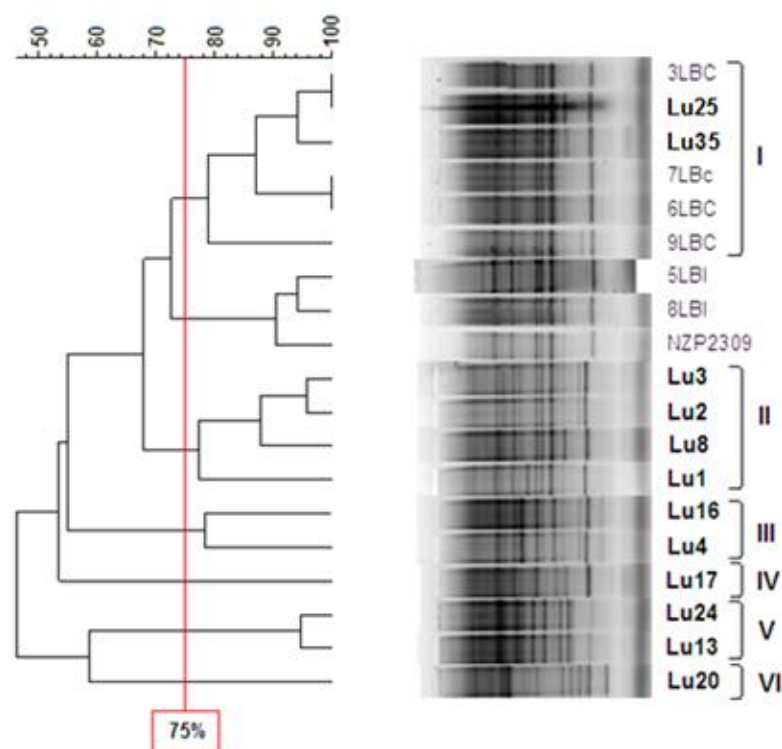


Figura 17: Gel de eletroforese referente aos isolados de *L. uliginosus*, amplificados por REP-PCR e respetivo dendograma, onde estão representados os grupos (I-VI) obtidos a 75 % semelhança.

4.4 Filogenia

4.4.1 Gene 16S rRNA

A amplificação do gene 16S rRNA dos isolados de *L. parviflorus* foi bem sucedida e cada isolado produziu uma banda de 1500 pb em gel de agarose (Figura 18).

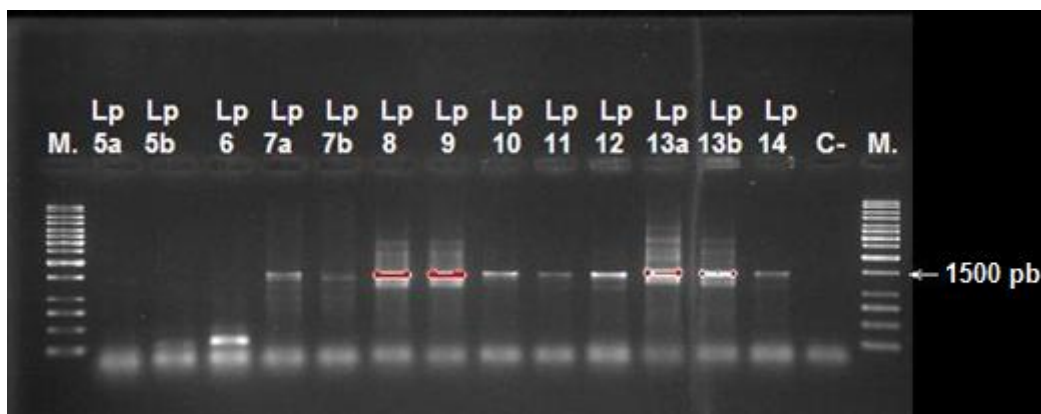
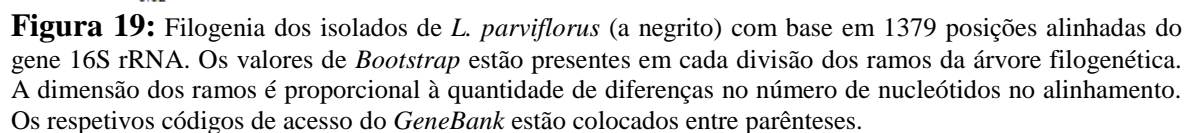


Figura 18: Exemplo da amplificação do gene 16S rRNA referente aos isolados de *L. parviflorus*. M.: marcador de pesos moleculares de 1kb (250 pb – 10000 pb). C-: controle negativo (sem DNA). As bandas a vermelho indicam apenas a deteção de bandas automaticamente efetuada pelo *software Quantity One*.

Em conformidade com os resultados anteriormente obtidos quando se analisou a diversidade por ERIC-PCR destes isolados, também para a análise filogenética do gene 16S rRNA se obteve homologia com vários géneros de bactérias diferentes, designadamente: *Agrobacterium/Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Massilia*, *Pseudomonas*, *Lysobacter*, *Sphingobacterium* e *Mucilaginibacter* (Figura 19).

A observação da árvore filogenética permitiu-nos verificar que os isolados Lp9, Lp12, Lp13b e Lp14 formaram um grupo isolado. A percentagem de semelhança entre si foi de 100 % e partilharam 99,8 % de identidade com a estirpe *Rhizobium rhizogenes*/*Agrobacterium rhizogenes* CCBAU 15144 (em alinhamentos de mais de 1323 nucleótidos (nt)). Esta estirpe foi originalmente isolada de nódulos de *Glycine soja*, no entanto, não possuiu depois a capacidade para nodular este mesmo hospedeiro (Wu, *et al.*, 2011). O isolado Lp8 agrupou-se com *Rhizobium* sp. Aei-4 (Kwon *et al.*, 2005), possuindo 99,7 % de identidade com este (em 1363 nt alinhados). O isolado Lp5a apresentou 100 % de identidade (em 1324 nt) com a estirpe *R. taibaishanense* CCNWSX 0457, primeiramente



isolada dos nódulos radiculares de *Kummerowia striata*, mas que posteriormente não teve capacidade de nodular as plantas hospedeiras da espécie da qual foi isolada (Yao *et al.*, 2012). O isolado Lp11 foi agrupado com a espécie *B. canariense*, obtendo uma identidade de 99,9 % com as estirpes SEMIA 928 e GV102, em 1366 nt alinhados. O isolado Lp13a foi englobado no género *Massilia*, e está filogeneticamente mais próximo da estirpe *Massilia* sp. III-116-18 (Hryniewicz *et al.*, 2010), com uma percentagem de identidade de 99,7 %. Os isolados Lp7a e Lp7b pertencem ao género *Lysobacter* e foram 100 % idênticos entre si para este gene. Dentro deste género, apresentaram maior identidade com *Lysobacter capsici* 6.2.3 (Postma *et al.*, 2010), com 99,9 % de similaridade em mais de 1418 nt alinhados. Relativamente ao isolado Lp6, foi colocado no género *Pseudomonas*, apresentando 99,9 % de identidade, tanto com *Pseudomonas* sp. BIM-B86 (Bazhanov & Yatsevich, 2011), como com *Pseudomonas* sp. OS19 (Drewniak *et al.*, 2008). Finalmente, os isolados Lp5b e Lp10 dispuseram-se em dois grupos diferentes, pertencentes aos géneros *Sphingobacterium* e *Mucilaginibacter*, mas incluídos na mesma família *Sphingobacteriaceae*. Para estes dois isolados obtiveram-se sequências pouco homólogas (< 98,65 %), e por isso, sem uma identificação ao nível da espécie (Kim *et al.*, 2014). Estes resultados revelam a falta de sequências desta família na base de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Para o estudo da filogenia dos isolados de *L. uliginosus*, e de modo a caracterizar-se os isolados mais distintos, foram selecionados apenas quatro, com os perfis de amplificação de REP-PCR mais distintos, designadamente: Lu4, Lu13, Lu17 e Lu20 (Figura 17). A amplificação do gene 16S rRNA dos isolados de *L. uliginosus* selecionados (Lu4, Lu13, Lu17, Lu20) permitiu verificar que todos evidenciaram a banda esperada de 1500 pb (Figura 20).

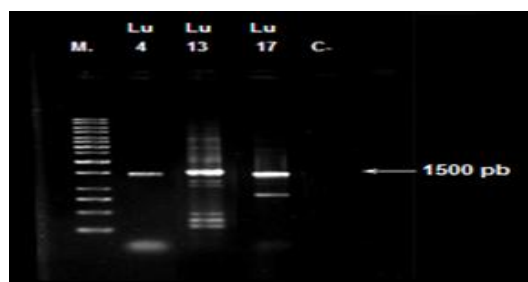


Figura 20: Amplificação do gene 16S rRNA por parte dos isolados de *L. uliginosus*. M.: marcador de pesos moleculares de 1kb (250 pb – 10000 pb). C-: controlo negativo (sem DNA).

Na análise filogenética do gene 16S rRNA destes isolados obteve-se maior homologia com o género *Bradyrhizobium*, para os isolados Lu4, Lu17 e Lu20, e com o género *Pantoea*, para o isolado Lu13 (Figura 21). O isolado Lu4 apresentou 100 % de identidade com várias espécies de *Bradyrhizobium*, revelando que a filogenia deste gene

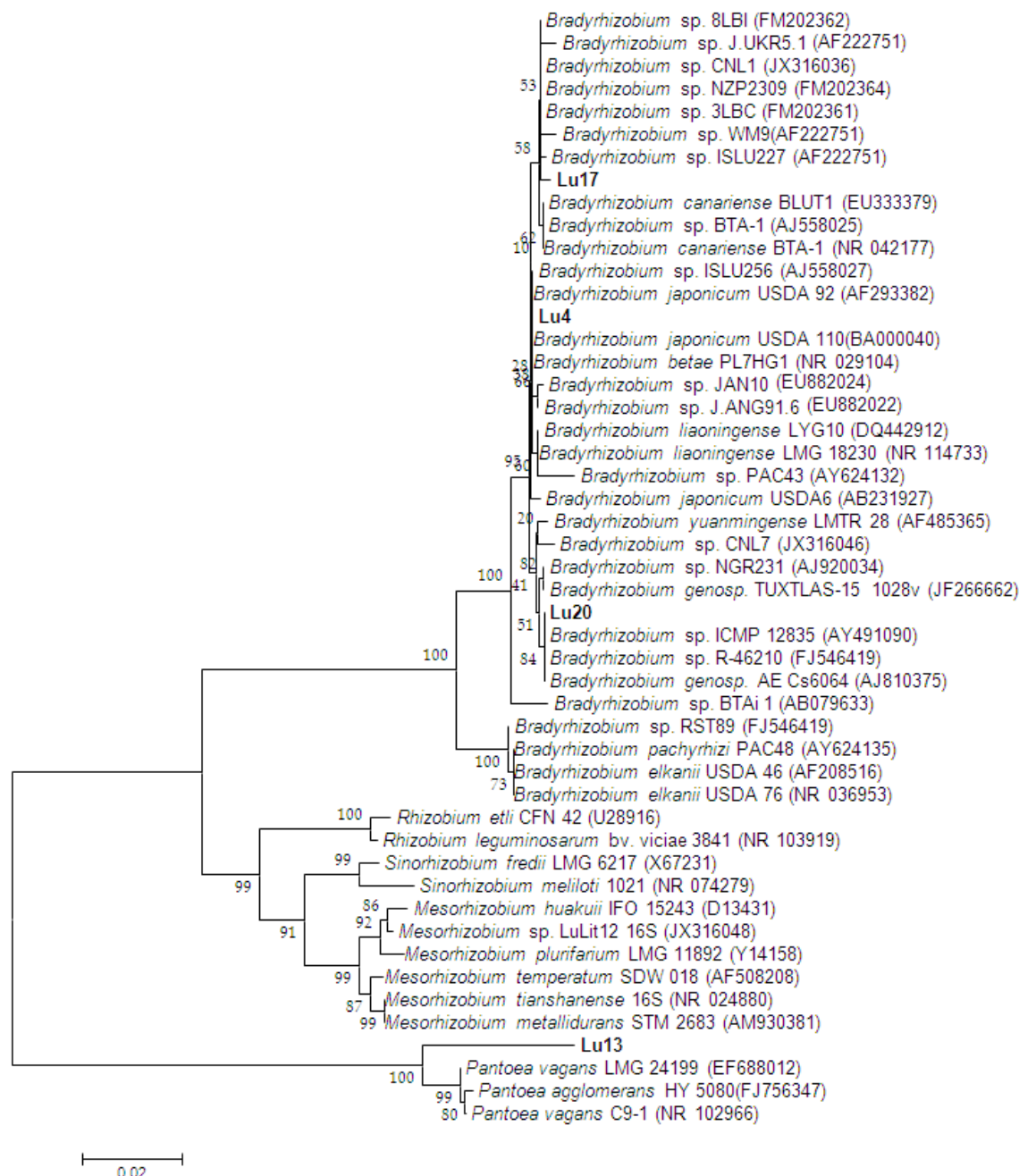


Figura 21: Filogenia dos isolados de *L. uliginosus* (a negrito) com base em 994 posições alinhadas do gene 16S rRNA. Os valores de *Bootstrap* estão presentes em cada divisão dos ramos da árvore filogenética. A dimensão dos ramos é proporcional à quantidade de diferenças no número de nucleótidos no alinhamento. Os respetivos códigos de acesso do *GeneBank* estão colocados entre parênteses.

não é muito eficaz para diferenciar as espécies deste género, tal como já referido por Vinuesa *et al.* (2005). O isolado Lu17, por outro lado, não obteve 100 % de similaridade com nenhuma estirpe. Contudo, obteve percentagens de identidade máximas de 99,5 % com várias estirpes do género *Bradyrhizobium* (Figura 21), entre as quais: *Bradyrhizobium* sp. ISLU227 e *Bradyrhizobium* sp. ICMP 12674. O isolado Lu20 obteve uma identidade de 100 % com *Bradyrhizobium* sp. R-46210 (num alinhamento de 1410 nt) (De Meyer *et al.*, 2011) e *Bradyrhizobium* genosp. AE Cs6064, isolada de nódulos de *Cytisus* (Lafay & Burdon, 2006). O isolado Lu13, que foi o único dos isolados de *L. uliginosus* que não teve capacidade de nodular nenhuma das plantas hospedeiras nos ensaios de nodulação realizados, foi agrupado no género *Pantoea*, mas revelou pouca homologia (<98,65 %) com as sequências das estirpes presentes no NCBI.

4.4.2 Genes *housekeeping*: *recA*, *atpD* e *glnII*

Nem todos os isolados de *L. parviflorus* tiveram a capacidade para amplificar os três genes *housekeeping* testados, *recA*, *atpD* e *glnII*. Por isso, para muitos deles, foi necessário desenhar *primers* específicos.

Em relação ao gene *recA*, a maioria dos isolados, à exceção dos isolados Lp5b e Lp10, amplificaram este gene com um dos conjuntos de *primers* para rizóbio descritos em Gaunt *et al.* (2001) (Figura 22). Para os que não amplificaram o gene, desenharam-se novos *primers*, mais específicos para o género *Sphingobacterium* e *Mucilaginibacter*. Porém, no caso do isolado Lp10, quando se utilizaram estes novos *primers* não houve amplificação.



Figura 22: Amplificação do gene *recA* referente aos isolados de *L. parviflorus*. M.: marcador de pesos moleculares de 1kb (250 pb – 10000 pb). C-: controlo negativo (sem DNA).

Para o gene *atpD* foi conseguida a amplificação com êxito para todos os isolados de *L. parviflorus*, recorrendo-se aos *primers* elaborados para rizóbio (Gaunt *et al.*, 2001) (Figura 23), e ainda a outros *primers*, mais específicos, desenhados para os isolados Lp5b, Lp6, Lp10 e Lp13a.

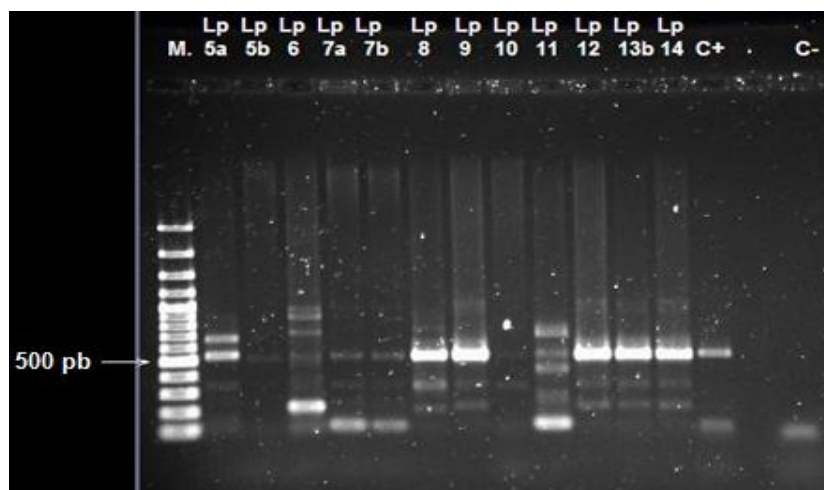


Figura 23: Amplificação do gene *atpD* referente aos isolados de *L. parviflorus*. M.: marcador de pesos moleculares de 100 pb plus (100 pb – 3000 pb). C-: controlo negativo (sem DNA). C+: Controlo positivo (*Bradyrhizobium* sp. 3LBC).

Quando se efetuou a amplificação do gene *glnII*, apenas para os isolados Lp8, Lp9, Lp11, Lp12, Lp13b e Lp14 foi possível observar nos géis de eletroforese, a amplificação da banda esperada de 700 pb, correspondente ao gene *glnII* (Figura 24). À exceção do isolado Lp5a, todos os outros onde não se verificou a amplificação deste gene, estão fora da família das *Rhizobiaceae*, o que explica os resultados obtidos, tendo em conta que este gene intervém no metabolismo da fixação de azoto.

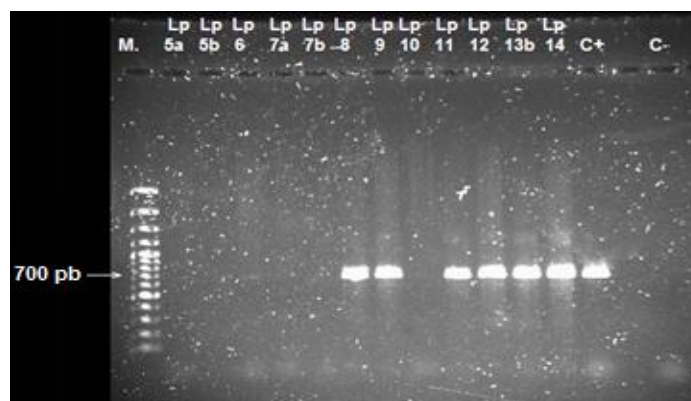


Figura 24: Amplificação do gene *glnII* referente aos isolados de *L. parviflorus*. M.: marcador de pesos moleculares de 100 pb plus (100 pb – 3000 pb). C-: controlo negativo (sem DNA). C+: Controlo positivo (*Bradyrhizobium* sp. 3LBC).

O isolado Lp5a, à semelhança do ocorrido para o gene 16S rRNA agrupou-se com *Rhizobium taibaishanense* (Figuras 25 e 26), porém, com percentagens muito inferiores e com maior homologia com uma estirpe diferente, designada de HAMBI 3214 (Mousavi *et al.*, 2014), apresentando uma similaridade de 98,7 %, num alinhamento de 462 nt, para o gene *recA* e 98,3 %, em 483 nt, para o gene *atpD*. Também o isolado Lp6, do mesmo modo que o ocorrido para o gene 16S rRNA, agrupou-se com estirpes do género *Pseudomonas* (Figuras 25 e 26), contudo com uma espécie diferente. Assim, este isolado possuiu maior homologia com a estirpe *P. korieensis* DSM16610 (Cámara *et al.*, 2007), com a qual partilhou 98,7 % de identidade no gene *atpD* (em 470 nt alinhados) e com a estirpe *P. korieensis* ps-7 (Andreani *et al.*, 2014), com a qual partilhou 97,2 % de similaridade para o gene *recA*, em 351 nt alinhados. O isolado Lp8, pertencente ao género *Rhizobium*, não obteve homologia com uma semelhança superior a 98,0 % nos três genes *housekeeping* testados (Figuras 25, 26 e 27). Poder-se-ia ter chegado a um resultado diferente caso a estirpe de *Rhizobium* sp. Aei-4 (com a qual partilhou 99,7 % de identidade, no gene 16S rRNA) possuísse sequências destes genes depositadas no NCBI.

Na análise filogenética do gene 16S rRNA dos isolados Lp7a e Lp7b obteve-se uma similaridade de 99,9 % com a estirpe *Lysobacter capsici* 6.2.3. Também na análise filogenética dos genes *recA* e *atpD* destes isolados, foi obtida maior homologia com *L. capsici*. No entanto, face à falta de sequências para estes genes, no NCBI, da estirpe 6.2.3, os isolados Lp7a e Lp7b foram agrupados com a estirpe AZ78 (Puopolo *et al.*, 2014) (Figuras 25 e 26). Obtiveram assim, 98,9 % dos nt idênticos num alinhamento de 436 nt para o gene *recA* e 98,2 % em 490 nt alinhados para o gene *atpD*.

Os isolados Lp9, Lp12, Lp13b e Lp14 agruparam-se sempre separadamente nas árvores filogenéticas, agrupando-se com percentagens de semelhança de 100 % entre si (Figuras 25, 26 e 27). No gene *recA*, a estirpe *Rhizobium* sp. R-45835 (De Meyer *et al.*, 2011), foi também incluída neste grupo.

Quanto ao isolado Lp11, foi agrupado com a espécie de *Bradyrhizobium canariense*, com similaridades superiores a 99,0 % nos três genes *housekeeping*, sendo *Bradyrhizobium canariense* OC1, isolada de *Lupinus* e de *Ornithopos*, a estirpe com maior similaridade (Stępkowski *et al.*, 2011) (Figuras 25, 26 e 27). Para esta estirpe, o isolado Lp11, obteve identidades respetivamente de 99,5 % no gene *atpD*, em 403 nt alinhados, 99,7 % no gene *glnII*, em 337 nt e 99,5 % no gene *recA*, com 411 nt alinhados. Para os

isolados Lp5b, Lp10 e Lp13a não foram encontradas sequências com elevado grau de homologia (Figuras 25 e 26).

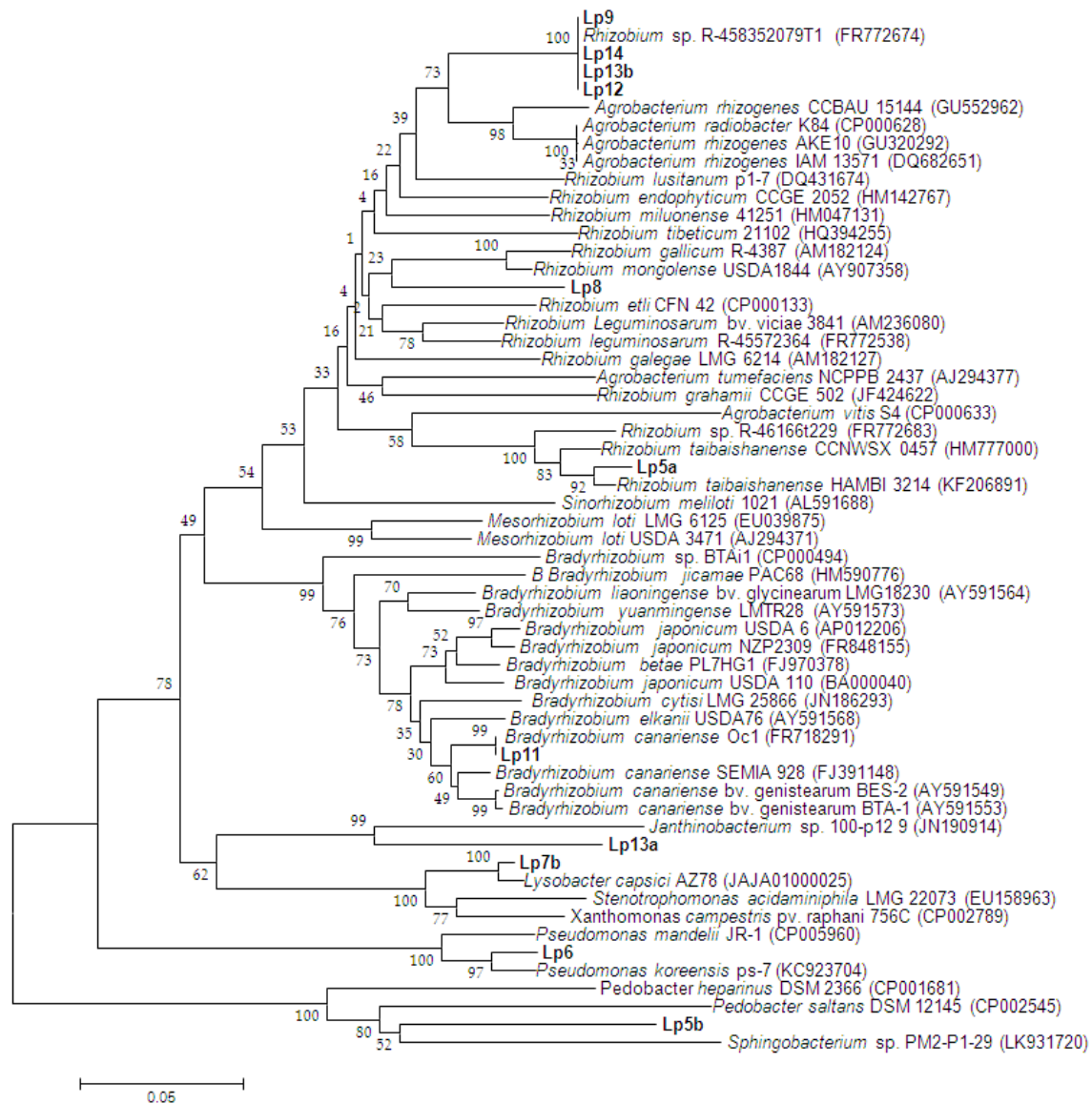


Figura 25: Filogenia dos isolados de *L. parviflorus* (a negrito) com base em 329 posições alinhadas do gene *recA*. Os valores de *Bootstrap* estão presentes em cada divisão dos ramos da árvore filogenética. A dimensão dos ramos é proporcional à quantidade de diferenças no número de nucleótidos (nt) no alinhamento. Os respectivos códigos de acesso do *GeneBank* estão colocados entre parênteses.

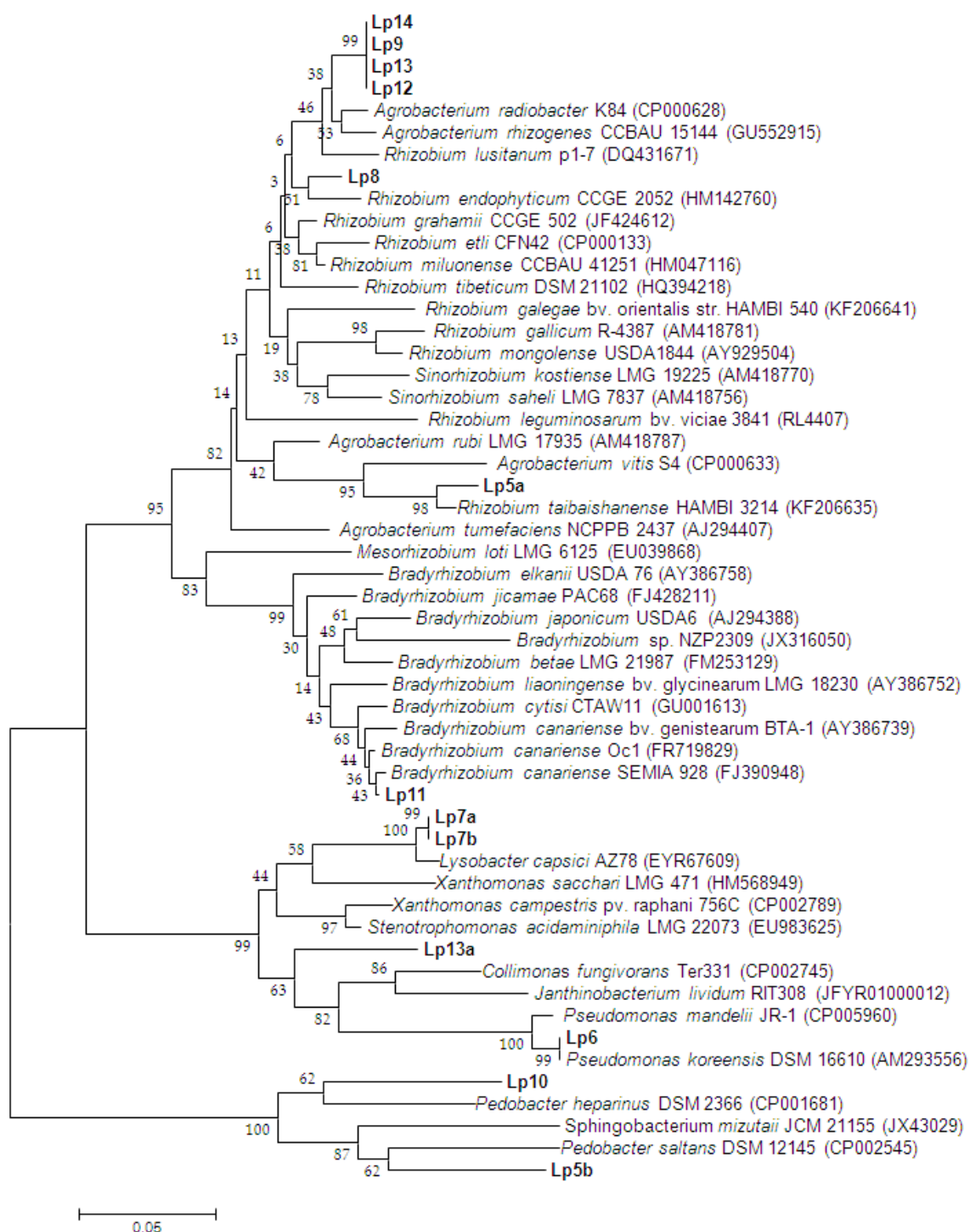


Figura 26: Filogenia dos isolados de *L. parviflorus* (a negrito) com base em 223 posições alinhadas do gene *atpD*. Os valores de *Bootstrap* estão presentes em cada divisão dos ramos da árvore filogenética. A dimensão dos ramos é proporcional à quantidade de diferenças no número de nucleótidos no alinhamento. Os respectivos códigos de acesso do *GeneBank* estão colocados entre parênteses.

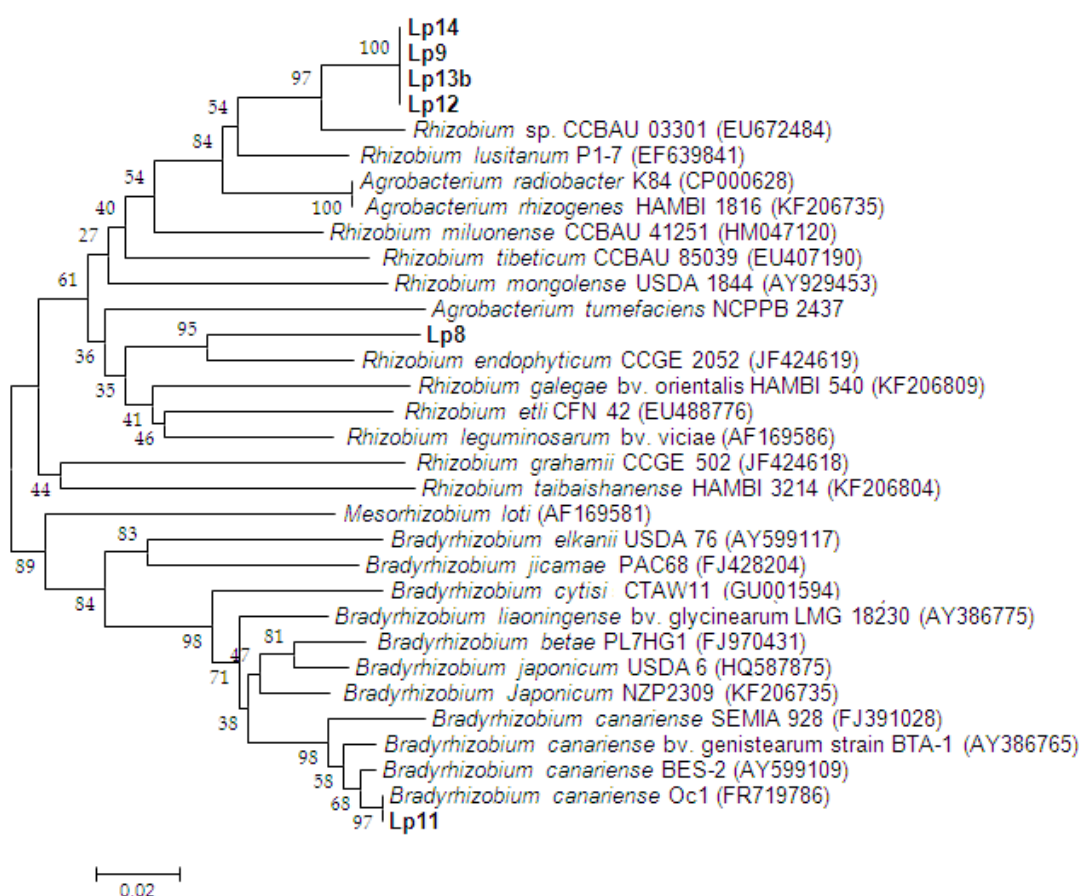


Figura 27: Filogenia dos isolados de *L. parviflorus* (a negrito) com base em 336 posições alinhadas do gene *glnII*. Os valores de *Bootstrap* estão presentes em cada divisão dos ramos da árvore filogenética. A dimensão dos ramos é proporcional à quantidade de diferenças no número de nucleótidos no alinhamento. Os respetivos códigos de acesso do *GeneBank* estão colocados entre parênteses.

Relativamente aos isolados de *L. uliginosus*, selecionados para a caracterização molecular, apenas para o isolado Lu13, não se verificou a amplificação dos genes *recA* e *glnII*. O facto deste isolado não estar incluído na família das *Rhizobiaceae*, explica a ausência de amplificação destes genes com os *primers* utilizados para rizóbio. Todos os restantes isolados, amplificaram com sucesso uma banda de aproximadamente 500 pb, para o gene *recA* e de 700 pb, para o gene *glnII* (Figura 28 e 29).

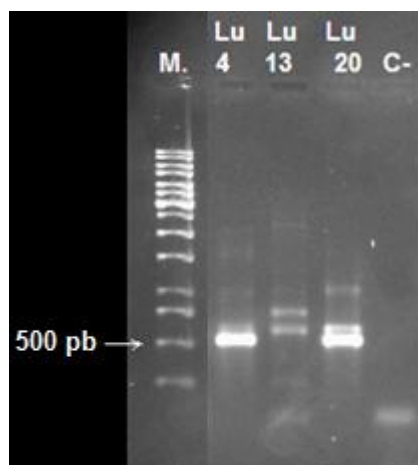


Figura 28: Amplificação do gene *recA* referente a isolados de *L. uliginosus*. M.: marcador de pesos moleculares de 1kb (250 pb – 10000 pb). C-: controlo negativo (sem DNA).

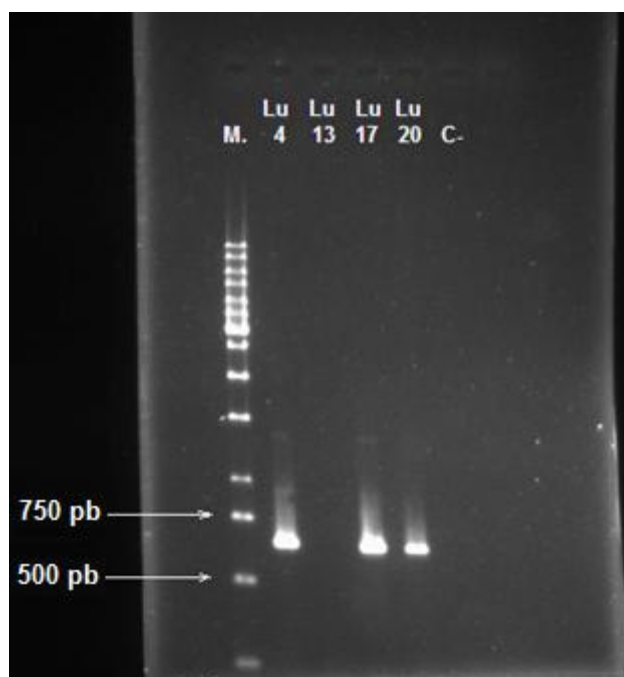


Figura 29: Amplificação do gene *glnII* referente aos isolados de *L. uliginosus*. M.: marcador de pesos moleculares de 1kb (250 pb – 10000 pb). C-: controlo negativo (sem DNA).

O isolado Lu4 obteve maior homologia com a estirpe *Bradyrhizobium* sp. LUP4, isolada também de *L. uliginosus*, mas no Uruguai (Batista *et al.*, 2013) (Figura 30) e possuindo 99,8 % nt idênticos, em 515 nt alinhados, do gene *glnII* e 100 % dos nt idênticos em 368 nt alinhados do gene *recA*. O isolado Lu17, está filogeneticamente muito próximo do agrupamento composto por *B. japonicum* bv. *genistearum* BLup-MR1 (Vinuesa *et al.*, 2005) e *Bradyrhizobium* sp. CNP29 (Batista *et al.*, 2013)(Figura 30). Isto é, possui uma

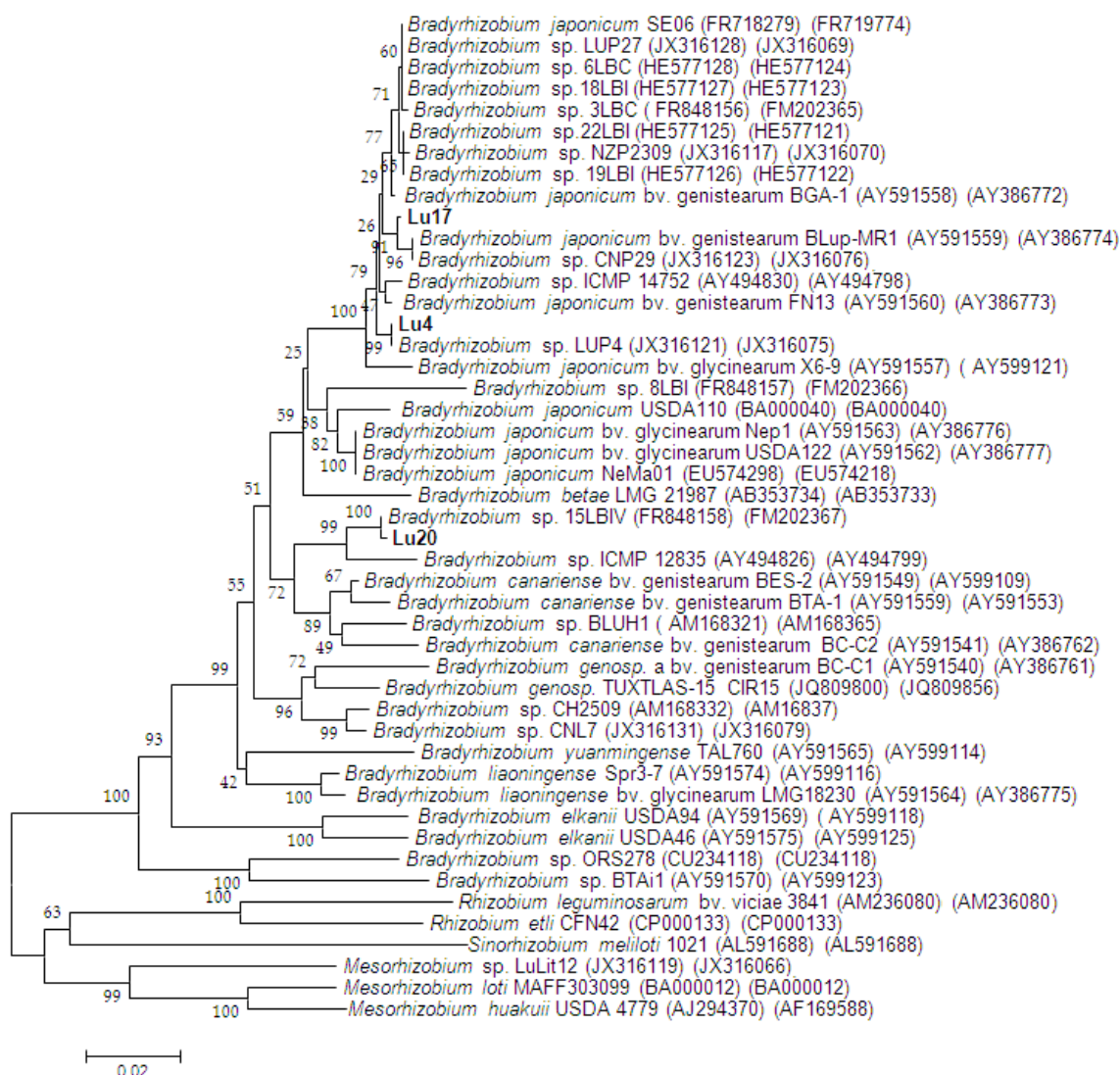


Figura 30: Filogenia dos genes *recA* (384 posições alinhadas) e *glnII* (445 posições alinhadas) concatenados, dos isolados de *Lotus uliginosus*. Os valores de *Bootstrap* estão presentes a cada divisão dos ramos da árvore filogenética. A dimensão dos ramos é proporcional à quantidade de diferenças no número de nucleótidos no alinhamento. Os respectivos códigos de acesso do *GeneBank* estão colocados entre parênteses.

identidade de 99,4 % para o gene *recA* e 100 % para o gene *glnII*, com *B. japonicum* bv. genistearum BLup-MR1, num alinhamento de 462 e 580 nt, respetivamente. Possui também, 99,8 % de identidade com a estirpe *Bradyrhizobium* sp. CNP29 para o gene *glnII*, num alinhamento de 512 nt e 99,2 % para o gene *recA*, num alinhamento de 368 nt. Finalmente, o isolado Lu20 agrupou-se com *Bradyrhizobium* sp. 15LBIV (Figura 30) (Lorite *et al.*, 2012), também isolado dos nódulos de *L. uliginosus* e no mesmo local (Estarreja). Este isolado possui 99,8 % de identidade para o gene *recA*, num alinhamento de 449 nt, e 99,0 % para o gene *glnII*, num alinhamento de 511 nt.

4.4.3 Genes simbióticos: *nodC* e *nifH*

Apenas o isolado Lp11, de *L. parviflorus*, amplificou os genes simbióticos *nodC* e *nifH*. Dos isolados de *L. uliginosus* selecionados, somente o isolado Lu13 não amplificou estes genes simbióticos (Figura 31).

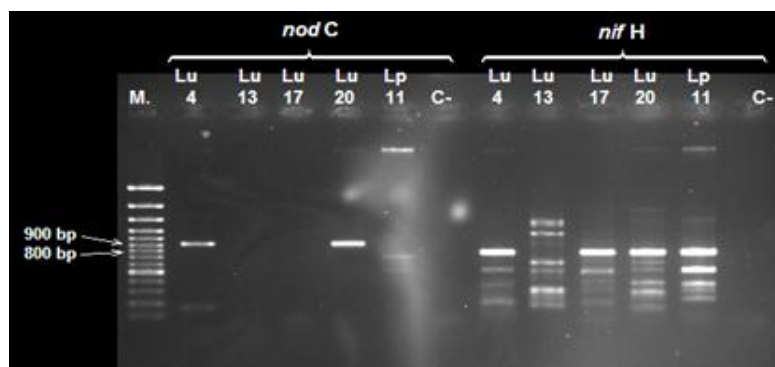


Figura 31: Exemplo da amplificação dos genes *nodC* e *nifH* referente aos isolados de *L. uliginosus* e *L. parviflorus* em estudo. M.: marcador de pesos moleculares de 1kb (250 pb – 10000 pb). C-: controlo negativo (sem DNA).

Para o gene *nodC* os isolados de *L. uliginosus* alvo deste estudo, agruparam-se todos num grande grupo com semelhanças entre 99,8 e 100 % (em alinhamentos com mais de 600 nt) entre si e com os isolados descritos em Lorite *et al.* (2012), com a estirpe comercial isolada de *L. uliginosus*, *Bradyrhizobium* sp. NZP 2309 (Batista *et al.*, 2013) e também com a estirpe *Bradyrhizobium* sp. CNG1 de Batista *et al.* (2013) (Figura 32).

O único isolado de *L. parviflorus* a amplificar o gene *nodC*, Lp11, ao contrário dos isolados de *L. uliginosus* não revelou uma identidade de 100 % com qualquer estirpe presente no NCBI. Contudo, para alinhamentos com mais de 500 nt, possuiu entre 99,1 a 99,3 % de semelhança com as estirpes isoladas dos nódulos de *Cytisus* (Figura 32), designadamente, *Bradyrhizobium* sp. CTO55 (Ahnia *et al.*, 2014), *Bradyrhizobium* sp. CTAW43 e *Bradyrhizobium* CTIF52 (Chahboune *et al.*, 2011).

Com base na filogenia do gene *nifH* os isolados de *L. uliginosus*, agruparam-se novamente com as estirpes descritas em Lorite *et al.* (2012) e em Batista *et al.* (2013), e com a estirpe *Bradyrhizobium* sp. NZP 2309 (Figura 33), num grande grupo com 100 % de identidade, entre os agrupados.

O isolado Lp11, de *L. parviflorus*, obteve para o gene *nifH*, ao contrário do gene *nodC*, maior homologia com a espécie de *Bradyrhizobium canariense* e com *Bradyrhizobium* sp. (Lotus) (> 99 %) (Figura 33). Não é perceptível na árvore filogenética

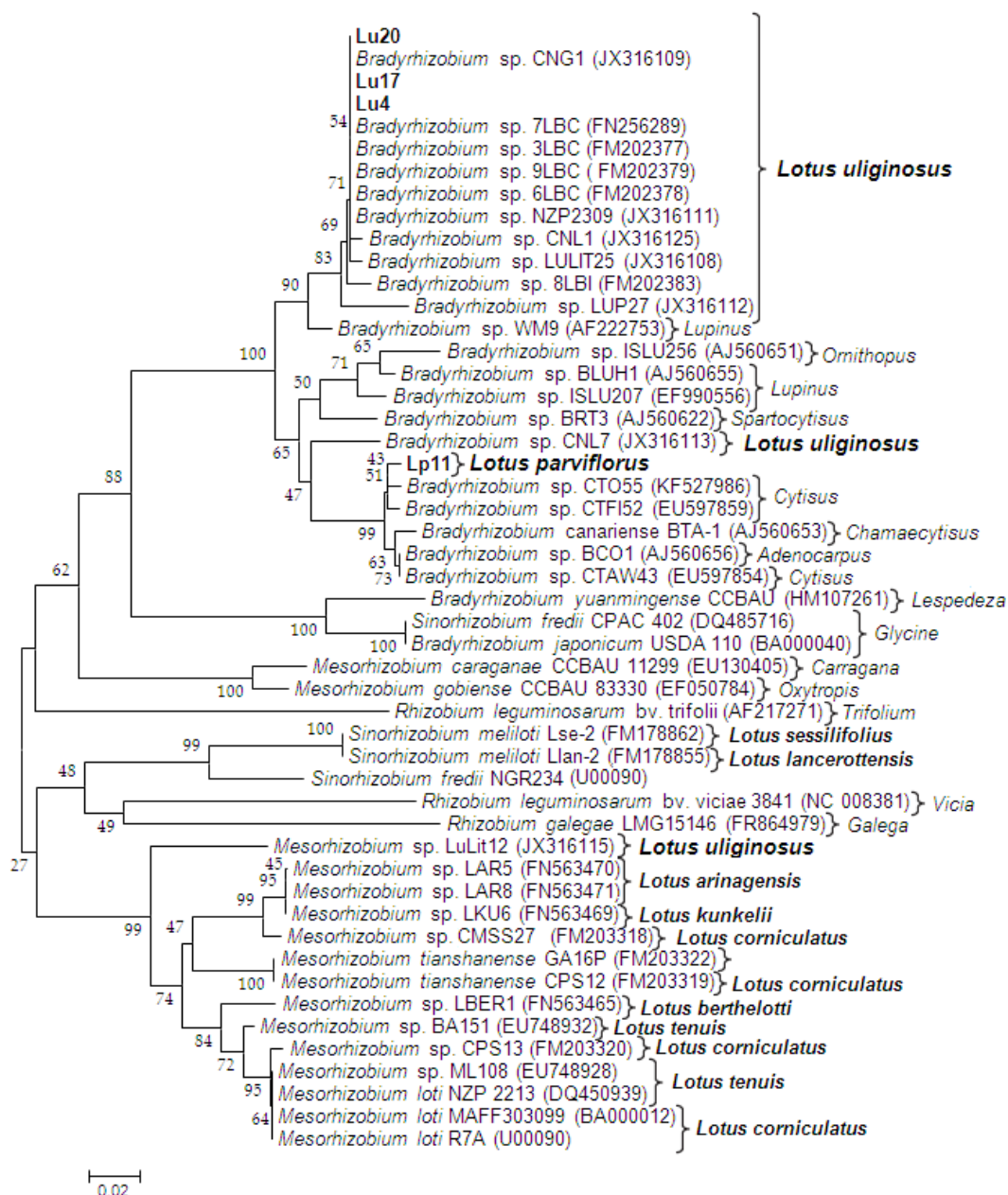


Figura 32: Filogenia dos isolados de *Lotus parviflorus* (Lp11) e *L. uliginosus* (Lu4, Lu17 e Lu20) (a negrito) com base em 203 posições alinhadas do gene *nodC*. Os valores de *Bootstrap* estão presentes em cada divisão dos ramos da árvore filogenética. A dimensão dos ramos é proporcional à quantidade de diferenças no número de nucleótidos no alinhamento. Os respectivos códigos de acesso do *GeneBank* estão colocados entre parênteses.

apresentada, qual a estirpe filogeneticamente mais próxima, devido ao facto desta árvore filogenética ter sido elaborada com base em alinhamentos de poucos nucleótidos, para que incluísse também as estirpes de Batista *et al.* (2013). Contudo, em alinhamentos com um número superior de nucleótidos, obteve maior homologia com a estirpe *B. canariense* SEMIA 928, com 99,3 % de similaridade num alinhamento de 666 nt. Esta estirpe foi isolada de *Lupinus* (Menna & Hungria, 2011).

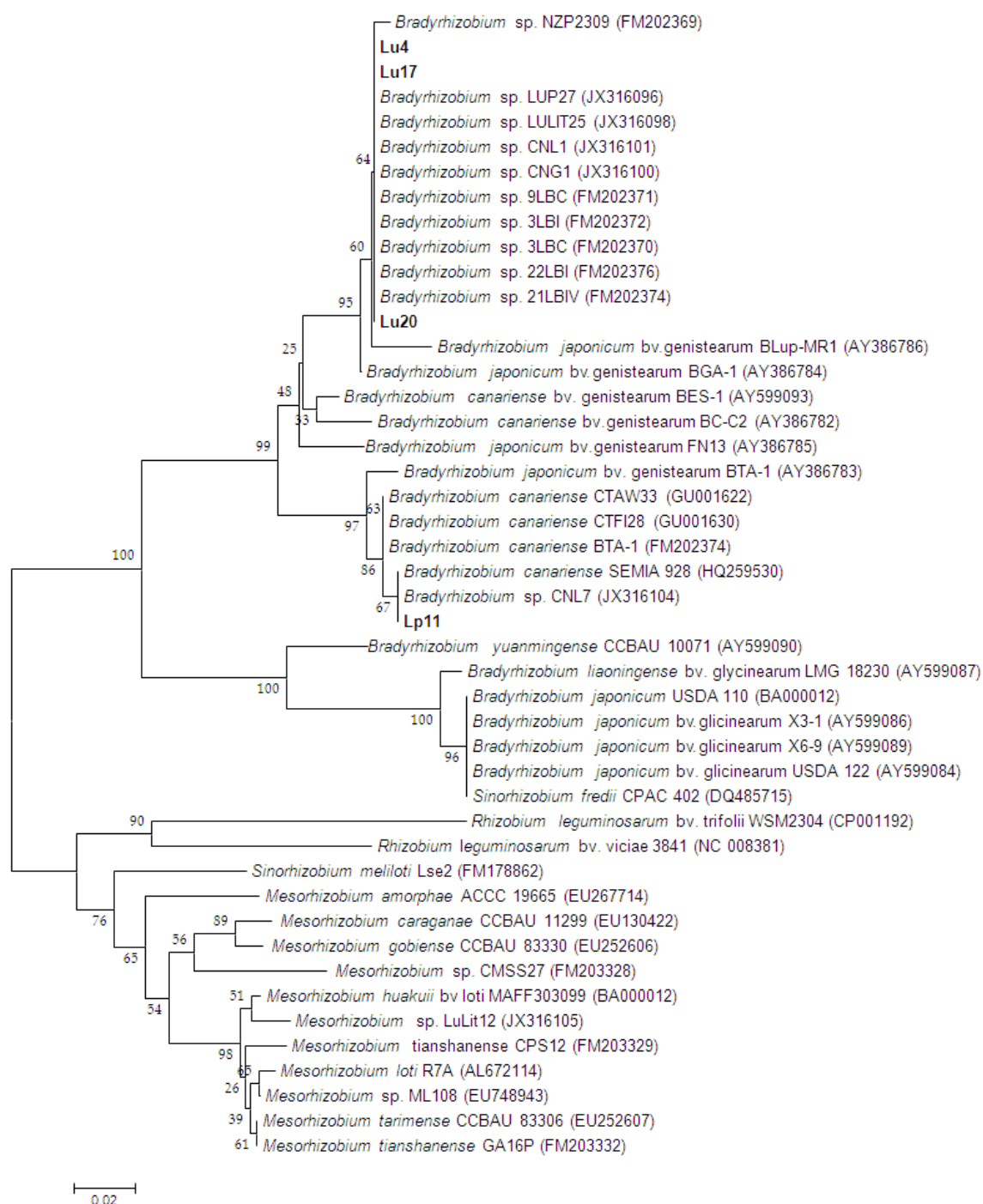


Figura 33: Filogenia dos isolados de *Lotus parviflorus* (Lp11) e *L. uliginosus* (Lu4, Lu17 e Lu20) (a negrito) com base em 197 posições alinhadas do gene *nifH*. Os valores de *Bootstrap* estão presentes em cada divisão dos ramos da árvore filogenética. A dimensão dos ramos é proporcional à quantidade de diferenças no número de nucleótidos no alinhamento. Os respectivos códigos de acesso do *GeneBank* estão colocados entre parênteses.

4.5 Ensaios de inoculação mista

Após a caracterização filogenética, verificou-se que muitos isolados de *L. parviflorus* não pertenciam à família *Rhizobiaceae* (Figuras 19, 25 e 26) e que apenas um (Lp11) nodulou as espécies de *Lotus* spp. testadas, incluindo *L. parviflorus*. Assim, para tentar provar a coexistência destes isolados com o isolado Lp11, nos nódulos, efetuaram-se ensaios com inoculação mista de isolados.

4.5.1 Fenótipo de nodulação e caracterização em meio diferencial

Após se ter verificado a presença/ausência de nódulos e calculado a percentagem simbiótica relativa das respectivas plantas de *L. uliginosus* inoculadas, concluiu-se que apenas se obteve fenótipo de nodulação eficaz (Fix⁺), quando se inoculou os isolados selecionados juntamente com o isolado Lp11. Caso contrário, obteve-se sempre o fenótipo Nod⁻ (Tabela 5).

Tabela 5: Fenótipo de nodulação resultante do ensaio de inoculação mista com os isolados de *L. parviflorus*, utilizando como planta hospedeira, *L. uliginosus* cv. Sunrise

	Fenótipo da nodulação
Lp5a + Lp11	Fix ⁺
Lp5b + Lp11	Fix ⁺
Lp6 + Lp11	Fix ⁺
Lp7b + Lp11	Fix ⁺
Lp8 + Lp11	Fix ⁺
Lp9 + Lp11	Fix ⁺
Lp13a + Lp11	Fix ⁺
Lp5a	Nod ⁻
Lp5b	Nod ⁻
Lp6	Nod ⁻
Lp7b	Nod ⁻
Lp8	Nod ⁻
Lp9	Nod ⁻
Lp13a	Nod ⁻
Lp11	Fix ⁺

Nod⁻: isolado que não nodula. Fix⁺: isolado nodula e fixa azoto.

Apesar da grande quantidade de nódulos analisados (Tabela 6) apenas se encontraram diferenças na morfologia das colónias, absorção de VC e velocidade de

crescimento face ao isolado Lp11, em dois dos isolados: Lp11-5a XIII e Lp11-7b VI (Tabela 6).

Tabela 6: Características dos isolados das inoculações mistas: número de nódulos isolados face ao número de nódulos existentes e o número de isolados diferentes do isolado Lp11.

	Número de isolados/ nº total de nódulos	Isolados diferentes de Lp11
Lp11 + Lp5a	11/50	1 (Lp11-5a XIII)
Lp11 + Lp5b	32/75	0
Lp11 + Lp6	5/16	0
Lp11 + Lp7b	25/62	1 (Lp11-7b VI)
Lp11 + Lp8	13/38	0
Lp11 + Lp9	30/65	0
Lp11Lp13a	22/90	0

4.5.2 Amplificação de ERIC-PCR

A partir dos perfis de amplificação por ERIC-PCR constatou-se que, apenas para os isolados Lp11-5a XIII e Lp11-7b VI se obtiveram perfis diferentes aos do isolado Lp11 (Figura 34). No entanto, para estes, não se obtiveram perfis de amplificação iguais a Lp5a e a Lp7b, respetivamente (Figuras 35 e 36).

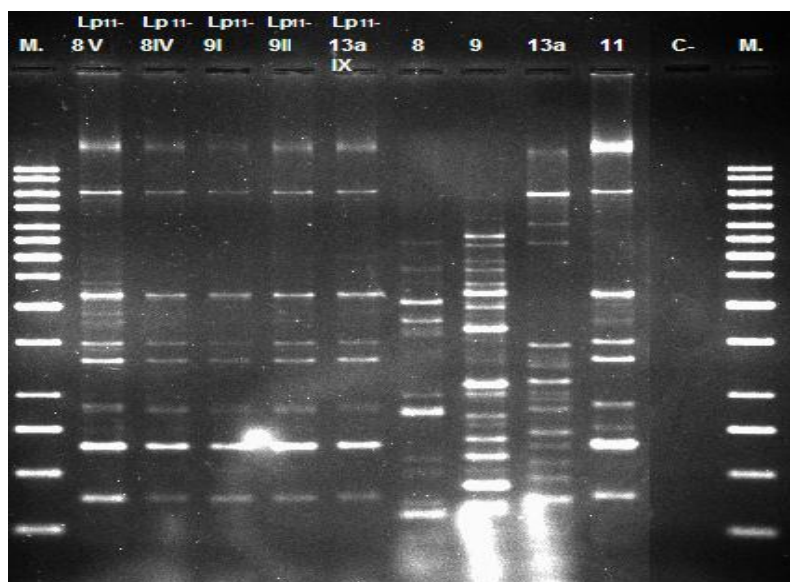


Figura 34: Eletroforese resultante da amplificação por ERIC-PCR de isolados provenientes de inóculos mistos: Lp11-8 V, Lp11-8 IV, Lp11-9 I, Lp11-9 II, Lp11-13a IX e dos isolados Lp8, Lp9, Lp11 e Lp13a. M.: marcador de pesos moleculares de 1kb (250 pb – 10000 pb). C-: controlo negativo (sem DNA).

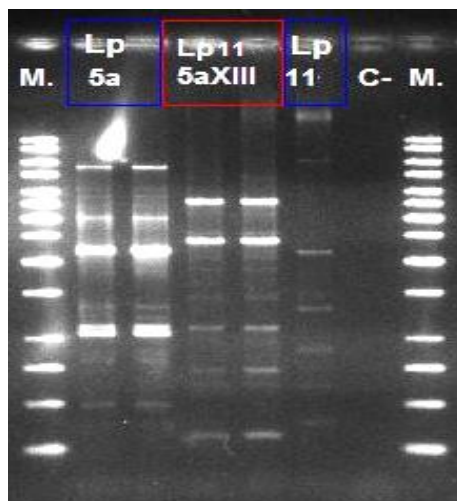


Figura 35: Eletroforese da amplificação por ERIC-PCR do isolado proveniente de inóculos mistos Lp11-5a XIII e dos isolados Lp5a e Lp11. M.: marcador de pesos moleculares de 1 kb. C-: controlo negativo.

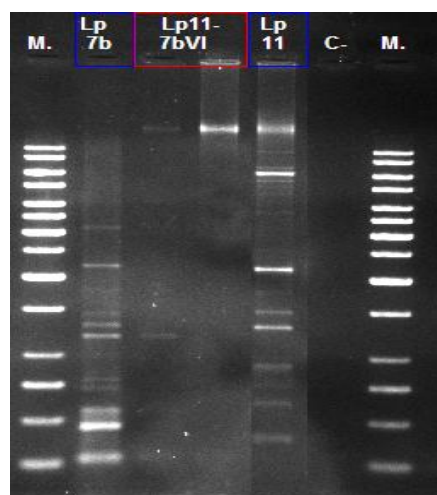


Figura 36: Eletroforese do ERIC-PCR do isolado proveniente de inóculos mistos Lp7b-11 VI e dos isolados Lp7b e Lp11. M.: marcador de pesos moleculares de 1 kb (250 pb - 10000 pb). C-: controlo negativo.

4.5.3 Amplificação e sequenciação do gene *recA*

De modo a esclarecer os resultados obtidos em placa e na amplificação por ERIC-PCR, procedeu-se à amplificação e sequenciação do gene *recA* de um dos isolados provenientes de cada inóculo misto.

Todos os isolados amplificaram uma banda na zona dos 500 pb (Figura 37).



Figura 37: Amplificação do gene *recA* relativamente aos isolados das inoculações mistas. M.: marcador de pesos moleculares de 1kb (250 pb – 10000 pb).C-: controlo negativo (sem DNA).

Os dados da sequenciação foram concordantes com os dados anteriormente obtidos na amplificação por ERIC-PCR e na análise em placa: apenas os isolados Lp11-5a XIII e Lp11-7b VI são distintos do isolado Lp11, amplificando fragmentos com uma sequência de nucleótidos totalmente diferente do isolado Lp11 para o gene *recA* (Tabela 7). No entanto, nos isolados Lp11-5b V, Lp11-6 I, Lp11-8 X e Lp11-9 II a banda amplificada correspondeu a um fragmento de outra zona do genoma e não do gene *recA*, o que não permitiu uma análise direta com o isolado Lp11, para este gene. Porém, através da pesquisa de sequências homólogas no BLAST, apenas o género *Bradyrhizobium*, onde, entre os isolados de *L. parviflorus* somente Lp11 está incluído (Figuras 19, 25, 26 e 27), surgiu com maior homologia (Tabela 8). Além disso, sequenciou-se também o fragmento obtido da amplificação com *primers* para o gene *recA*, de um dos isolados dos nódulos das plantas inoculadas apenas com o isolado Lp11 (Lp11-11 IV), e este foi entre 99,3 a 100 % idêntico aos dos isolados em questão, tendo também amplificado a mesma zona, ao invés do gene *recA* (Tabela 8).

O gene *recA* sequenciado, do isolado Lp11-7b VI, obteve 100 % de identidade (num alinhamento de 411 nt) com o respetivo gene do isolado Lp7b (Tabela 7). Deste modo, fica demonstrado como o isolado Lp7b que não possui a capacidade para nodular *Lotus* possa ter surgido nos nódulos de *L. parviflorus*.

O gene *recA* sequenciado, de Lp11-5a XIII, não apresentou 100 % de identidade ou próximo, nem com o isolado Lp11, nem com Lp5a. Obteve, ao invés, 96,4 % de identidade com *Pseudomonas fluorescens* (Tabela 8). Deste modo suspeita-se que tenha sido uma contaminação pontual.

Tabela 7: Percentagens de identidade (Id.) dos alinhamentos efetuados para os isolados dos ensaios de inoculação mista em relação ao gene *recA*.

	Id. com os isolados da mistura de inoculação	
Lp11-5a XIII	Lp5a: 77,6% (em 411 posições)	Lp11: 71% (em 452 posições)
Lp11-5b V	Lp5b: 26,8% (em 413 posições)	Lp11: 30,5% (em 380 posições)
Lp11-6 I	-	<u>Lp11:</u> 100% (em 289 posições)
Lp11-7b VI	<u>Lp7b:</u> 100% (em 411 nt)	-
Lp11-8 X	Lp8: 26,8% (em 406 posições)	Lp11: 30,1% (em 379 posições)
Lp11-9 II	Lp9: 29,3% (em 405 posições)	Lp11: 30,9 % (em 379 posições)
Lp11-13a IX	-	<u>Lp11:</u> 100% (em 189 nt)

Tabela 8: Percentagens de identidade (Id.) dos alinhamentos efetuados para os isolados dos ensaios de inoculação mista com as sequências mais homólogas do NCBI e com o isolado Lp11-11 IV.

	Maior homologia no NCBI		Id. com Lp11-11 IV
Lp11-5a XIII	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SF4c	96,4% (em 472 nt)	32,5% (em 400 posições)
Lp11-5b V	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	97,4% (em 153 nt)	99,3% (em 150 nt)
Lp11-6 I	-		
Lp11-7b VI	-		
Lp11-8 X	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	98,0% (em 152 nt)	100% (em 150 nt)
Lp11-9 II	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	98,0% (em 152 nt)	100% (em 150 nt)
Lp11-13a IX	-		

4.6 Outras atividades promotoras do crescimento vegetal

4.6.1 Solubilização de fosfato inorgânico

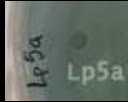

Não se verificou a solubilização de fosfato, em nenhum dos isolados de *L. parviflorus* e *L. uliginosus*, apesar de vários estudos referirem a existência de rizóbios isolados dos nódulos de leguminosas com a capacidade para solubilizar o fosfato insolúvel (Kumar & Ram, 2014). De um modo geral, assume-se que as bactérias rizóbio, juntamente com os géneros *Pseudomonas* e *Bacillus*, são das bactérias do solo com maior capacidade

para este efeito (Rodríguez & Fraga, 1999). Por vezes, fatores nutricionais, fisiológicos e de crescimento poderão ter influência na capacidade para solubilizar o fosfato, podendo-se não estar a reunir as condições para a solubilização do fosfato, para certas estirpes, em laboratório, como indica Cunningham & Kuiack (1992).

4.6.2 Quelatação de ferro extracelular

O isolado Lp6, foi o único em que se detetou a produção de sideróforos (Tabela 9). Lp6 está descrito como pertencendo ao género *Pseudomonas* (Figuras 19, 25 e 26), género

Tabela 9: Produção de sideróforos dos isolados de *L. parviflorus* e *L. uliginosus*.

		Produção de sideróforos	
Isolados de <i>L. parviflorus</i>	Lp5a	-	
	Lp5b	-	
	Lp6	+	
	Lp7a	-	
	Lp7b	-	
	Lp8	-	
	Lp9	-	
	Lp10	-	
	Lp11	-	
	Lp12	-	
	Lp13a	-	
	Lp13b	-	
	Lp14	-	
Isolados de <i>L. uliginosus</i>	Lu1	-	
	Lu2	-	
	Lu4	-	
	Lu8	-	
	Lu13	-	
	Lu16	-	
	Lu17	-	
	Lu20	-	
	Lu35	-	


este, muitas vezes referido como produtor de sideróforos, nomeadamente a espécie *P. fluorescens* (Lemanceau & Alabouvette, 1993; Sayyed *et al.*, 2005).

Embora esteja documentado que a produção de sideróforos está intimamente ligada ao processo de antagonismo contra agentes patogénicos de plantas, e também possa estar relacionada com o processo de fixação de azoto, pois as proteínas, leghemoglobina e nitrogenase, possuem ferro na sua composição (Franza *et al.*, 2005; Sridevi, 2008), não se encontraram tais relações.

4.6.3 Hidrólise da celulose e pectina

Apenas os isolados Lp7a e Lp7b revelaram a presença da enzima celulase (Tabela 10). Quanto à pectinase não houve nenhum isolado em que esta tenha sido detetada. Deste

Tabela 10: Hidrólise da celulose pelos isolados de *L. parviflorus* e *L. uliginosus*.




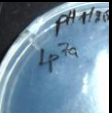


		Hidrólise da celulose	
Isolados de <i>L. parviflorus</i>	Lp5a	-	
	Lp5b	-	
	Lp6	-	
	Lp7a	+	
	Lp7b	+	
	Lp8	-	
	Lp9	-	
	Lp10	-	
	Lp11	-	
	Lp12	-	
	Lp13a	-	
	Lp13b	-	
	Lp14	-	
Isolados de <i>L. uliginosus</i>	Lu1	-	
	Lu2	-	
	Lu4	-	
	Lu8	-	
	Lu13	-	
	Lu16	-	
	Lu17	-	
	Lu20	-	
	Lu35	-	

modo, à exceção de Lp7a e Lp7b, os restantes isolados deverão ter outras estratégias para a entrada na planta, já que foram isolados dos nódulos radiculares. No entanto, como por vezes para a entrada na planta são necessárias apenas quantidades mínimas destas enzimas, os métodos em placa poderão não ser suficientemente sensíveis para detetar estas pequenas quantidades (Mateos *et al.*, 1992).

4.6.4 Ensaio de antagonismo a agentes fitopatogénicos

Entre os isolados de *L. parviflorus* e de *L. uliginosus* testados, apenas Lp7a e Lp7b inibiram o crescimento de *P. cinnamomi* e de *B. corticola* (Tabela 11). Os restantes

Tabela 11: Inibição do crescimento de *P. cinnamomi* e *B. corticola* pelos isolados de *L. parviflorus* e *L. uliginosus*.

		<i>P. cinnamomi</i>				<i>B. corticola</i> CH7	
		1160		1186			
Isolados de <i>L. parviflorus</i>	Lp5a	-		-		-	
	Lp5b	-		-		-	
	Lp6	-		-		-	
	Lp7a	+		+		+	
	Lp7b	+		+		+	
	Lp8	-		-		-	
	Lp9	-		-		-	
	Lp10	-		-		-	
	Lp11	-		-		-	
	Lp12	-		-		-	
	Lp13a	-		-		-	
	Lp13b	-		-		-	
	Lp14	-		-		-	
Isolados de <i>L. uliginosus</i>	Lu1	-		-		-	
	Lu2	-		-		-	
	Lu4	-		-		-	
	Lu8	-		-		-	
	Lu13	-		-		-	
	Lu16	-		-		-	
	Lu17	-		-		-	
	Lu20	-		-		-	
	Lu35	-		-		-	

isolados foram incapazes de inibir o crescimento destes dois agentes fitopatogénicos de plantas. Assim, foram encontrados neste estudo, dois promissores isolados inibidores de dois fitopatogénios eucariotas de reinos diferentes (*Fungi* e *Chromista*). De facto, o género *Lysobacter*, do qual fazem parte estes isolados, está descrito como potencial agente de biocontrolo, tendo a capacidade de provocar a lise duma grande variedade de microrganismos que incluem, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, algas verdes e nemátodes, possuindo um elevado interesse biotecnológico pela produção de enzimas e antibióticos (Christensen & Cook, 1978; Postma *et al.*, 2010).

5. Discussão geral

A caracterização dos microssimbiontes fixadores de azoto de diversas espécies de *Lotus*, tem revelado a existência de uma grande diversidade de bactérias, isoladas de nódulos radiculares que não pertencem às espécies de rizóbio tradicionais, ou seja, *Bradyrhizobium* e *Mesorhizobium*. Também para esta diversidade, tem contribuído a caracterização molecular das bactérias isoladas dos nódulos de plantas silvestres de *Lotus* spp., e que têm sido objeto de diversos estudos nos últimos anos (De Meyer *et al.*, 2011; Lorite *et al.*, 2010; Rejili *et al.*, 2009).

Assim, o objetivo principal deste trabalho foi a caracterização, a nível fenotípico e molecular, das bactérias isoladas dos nódulos radiculares de uma espécie de *Lotus* silvestre (*L. parviflorus*) e outra, também pertencente ao género *Lotus*, mas, cultivada e com interesse agrícola (*L. uliginosus*).

Os resultados obtidos neste estudo mostraram a existência de uma grande diversidade entre os isolados de *L. parviflorus*, contrariamente ao que se observou nos isolados de *L. uliginosus*. No entanto, a maioria dos isolados de *L. parviflorus*, à excepção de Lp11, não possuíam capacidade para nodular as diversas espécies de *Lotus*, incluindo o hospedeiro original, *L. parviflorus*.

Para se tentar explicar estes resultados efetuaram-se ensaios de inoculação mista, tendo-se, para isso, utilizado sempre o isolado Lp11, juntamente com um dos outros isolados seleccionados. Para o caso do isolado Lp7b, que não possuiu a capacidade para nodular, conseguiu-se demonstrar como pode ter surgido nos nódulos de *L. parviflorus*. Assim, pensamos que devido ao facto do isolado Lp11 possuir o crescimento mais lento entre os isolados Lp, durante o isolamento das bactérias dos nódulos, Lp7b, ou outro eventual isolado (à excepção de Lp11), terá inibido o crescimento da estirpe que, efetivamente, teria a capacidade para nodular, como por exemplo Lp11. Deste modo, apenas se conseguiu isolar do nódulo, com sucesso, a bactéria sem a capacidade para nodular. Não se descarta, no entanto, a hipótese de se terem isolado bactérias do interior da raiz, em zonas próximas dos nódulos, e não dos nódulos em si, pois, como se tratam de nódulos pequenos, estes são retirados da planta com uma pequena porção de raiz nas extremidades. Assim, o isolado Lp11, foi o único que teve a capacidade para nodular plantas de *Lotus* spp., tendo nodulado de forma eficaz *L. parviflorus* e *L. uliginosus*, com 50 % e 11 % de eficácia, respetivamente. Nodulou também, embora de forma ineficaz, *L.*

corniculatus e *L. tenuis*. Este isolado é de crescimento lento e foi caracterizado taxonomicamente como pertencendo à espécie de *Bradyrhizobium canariense*, estando muito próximo da estirpe *B. canariense* OC1, que foi isolada de *Lupinus* e de *Ornithopus*. Em relação aos genes simbióticos, este isolado está próximo de estirpes pertencentes também a *Bradyrhizobium*, que nodulam espécies do género *Cytisus*.

Os restantes isolados de *L. parviflorus* fazem parte dos géneros: *Sphingobacterium* (Lp5b), *Pseudomonas* (Lp6), *Lysobacter* (Lp7a e Lp7b) *Mucilaginibacter* (Lp10), *Massilia* (Lp13a) e *Agrobacterium/Rhizobium* (Lp5a, Lp8, Lp9, Lp12, Lp13b e Lp14). Muitos destes géneros, estão fora da família das *Rhizobiaceae*, razão pela qual estes isolados não conseguiram nodular as diferentes espécies de plantas de *Lotus* testadas. Por outro lado, os isolados Lp5a e Lp13b revelaram ser patogénicos ao promoverem zonas com necrose e tumores nas raízes, respetivamente. Pela filogenia do 16S rRNA, *recA* e *atpD*, a estirpe Lp5a está incluída na espécie *R. taibaishanense*, que foi primeiramente isolada dos nódulos de *K. striata*. Não está descrita como sendo patogénica, ao contrário do constatado no presente trabalho. Também não está descrita como simbiótica, o que, neste caso, está em conformidade com os resultados obtidos no presente trabalho. Quanto ao isolado Lp13b foi colocado filogeneticamente muito próximo de *R. rhizogenes* e *A. radiobacter*, duas espécies conhecidas por serem patogénicas.

Além da fixação de azoto, alguns isolados de *L. parviflorus* mostraram também possuir outras atividades importantes, associadas à promoção de crescimento vegetal. Assim, o isolado Lp6 produz sideróforos, que são moléculas que quelatam o ferro extracelular, podendo-o disponibilizar para as plantas e eventualmente inibir potenciais fitopatogénios. Os isolados Lp7a e Lp7b possuem a capacidade de degradar a celulose, implícita em associações benéficas e patogénicas. Também revelaram serem promissores inibidores do crescimento dos agentes fitopatogénicos estudados: *P. cinnamomi* e *B. corticola*. Para além destas atividades promotoras de crescimento, os isolados Lp7a e Lp7b deverão possuir outros mecanismos de promoção do crescimento vegetal que não foram testados, pois nos ensaios de nodulação, com meio sem azoto, aumentaram significativamente o peso seco das plantas, mas não formaram nódulos. Poderão, por exemplo, produzir grandes quantidades de fitohormonas ou fixar o azoto atmosférico sem se associarem endossimbioticamente.

De modo inverso, os isolados de *Lotus uliginosus* não revelaram nenhuma atividade promotora de crescimento vegetal, para além da fixação de azoto. Por outro lado, verificou-se que nos ensaios de nodulação, o isolado Lu13, não nodulou as diferentes plantas de *Lotus* spp. testadas, inclusivamente o hospedeiro original, *L. uliginosus*. Este isolado foi identificado como pertencente ao género *Pantoea*, género que se encontra fora da família das *Rhizobiaceae*. Assim, tal como aconteceu com a maioria dos isolados de *L. parviflorus* (os que não nodularam nenhuma das plantas hospedeiras de *Lotus*), pensa-se que a presença deste isolado no nódulo poderá ser explicada por um processo similar. Os restantes isolados nodularam eficazmente *L. uliginosus* e *L. parviflorus*. Nodularam também, embora de forma ineficaz, *L. tenuis* e *L. corniculatus*. Os três isolados de *L. uliginosus* selecionados para a caracterização molecular e com capacidade simbiótica, Lu4, Lu17 e Lu20, obtiveram homologia de 100 % ou muito próximo, para os genes 16S rRNA, *glnII* e *recA* com alguns isolados já descritos em Lorite *et al.* (2012) e em Batista *et al.* (2013). Verificou-se que o isolado Lu4 está filogeneticamente muito próximo de *Bradyrhizobium* sp. LUP4, isolado de *L. uliginosus* do Uruguai (Batista *et al.*, 2013). O isolado Lu20 obteve maior homologia com a estirpe *Bradyrhizobium* sp. 15LBIV. Esta estirpe, foi isolada de *L. uliginosus*, do mesmo local (Estarreja) dos isolados deste estudo. O isolado Lu17 encontra-se filogeneticamente próximo da estirpe de *Bradyrhizobium* sp. CNP29 (também descrita em Batista *et al.* (2013)) e de *B. japonicum* bv. genistearum BLup-MR1. Deste modo, encontraram-se estirpes homólogas às dos estudos anteriormente realizados com bactérias isoladas dos nódulos de *L. uliginosus*, quer em Portugal (Lu20), quer no Uruguai (Lu4 e Lu17), estando relacionadas com *Bradyrhizobium* sp. (Lotus) e *Bradyrhizobium japonicum* bv. genistearum. Os genes simbióticos *nodC* e *nifH*, dos isolados de *L. uliginosus*, foram entre 99,7 a 100 % homólogos entre si, e 100 % homólogos com algumas estirpes descritas em Lorite *et al.* (2012) e em Batista *et al.* (2013), o que está de acordo com o facto de terem sido isolados dos nódulos da mesma espécie de planta e os genes analisados fazerem parte dos necessários para a nodulação. Contudo, neste estudo encontrou-se menos variabilidade em comparação com os anteriores, para estes genes. De facto, os autores Batista *et al.* (2013) encontraram pela primeira vez, uma estirpe capaz de nodular *L. uliginosus* pertencente ao género *Mesorhizobium*, que nos genes simbióticos foi agrupada também com bactérias do género *Mesorhizobium*. Apesar de neste estudo se terem selecionado os isolados, com base nas

diferenças de perfis de REP-PCR face aos isolados descritos em Lorite *et al.* (2012), mesmo assim, não foi suficiente para se encontrarem isolados muito distintos aos dos estudos anteriores, o que revela que a planta, neste caso *L. uliginosus*, é nodulada, maioritariamente, por bactérias filogeneticamente muito semelhantes, ao contrário de outras leguminosas que podem ser noduladas por muitas bactérias distintas.

Os resultados mostraram também qual a especificidade dos hospedeiros em relação a determinadas estirpes, como é o caso do isolado Lp11, que nodulou eficazmente *L. parviflorus*, o seu hospedeiro de origem, mas também *L. uliginosus*, enquanto que os isolados de *L. uliginosus* nodularam eficazmente o seu hospedeiro de origem e também *L. parviflorus*. Nenhuma destas estirpes foi capaz de produzir nódulos eficazes em *L. corniculatus* e *L. tenuis*. Estes dois hospedeiros são, de facto, normalmente nodulados pelas mesmas estirpes de bactérias de rizóbio como, por exemplo, *Mesorhizobium loti* (Fulchieri *et al.*, 2001; Jarvis *et al.*, 1982; Sullivan *et al.*, 1996). Os resultados mostraram também que tanto os isolados de *L. uliginosus* como o isolado Lp11, o único dos isolados de *L. parviflorus* com capacidade para nodular, foram filogeneticamente próximos, quer nos genes simbióticos, quer nos *housekeeping*, de estirpes isoladas dos nódulos de plantas da tribo *Genisteae*, como por exemplo, os géneros *Lupinus* e *Cytisus*. De facto, está descrito que espécies desta tribo e a espécie *L. uliginosus* partilham os mesmos rizóbios (De Meyer *et al.*, 2011; Jensen, 1967; Lorite *et al.*, 2012), o que foi também constatado no presente estudo com o isolado Lp11 de *L. parviflorus*, que como já foi referido anteriormente, nodulou de forma eficaz *L. uliginosus*.

6. Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram a caracterização fenotípica e molecular das estirpes bacterianas dos nódulos de duas espécies de *Lotus*. Assim, através do isolamento das bactérias dos nódulos de *L. parviflorus*, encontrou-se um isolado (Lp11) capaz de nodular novamente *L. parviflorus*, com eficácia simbiótica, pertencente a *B. canariense* e que obteve maior homologia nos genes simbióticos *nodC* e *nifH* com bactérias igualmente do género *Bradyrhizobium* (com estirpes de *Bradyrhizobium* sp. e *Bradyrhizobium canariense*), isoladas de *Lupinus* e de *Cytisus*. Os restantes doze isolados não foram capazes de nodular *Lotus* spp., incluindo *L. parviflorus* e muitos deles não pertencem à família *Rhizobiaceae*. Deverão ter coexistido nos nódulos com as estirpes com capacidade para nodular e inibido o crescimento após o isolamento dos nódulos e crescimento em meio de cultura.

Alguns destes isolados, apesar de não se associarem endossimbioticamente com *Lotus* spp., revelaram ser promissores promotores do crescimento vegetal, pelas atividades associadas, que foram demonstradas através da produção de sideróforos pelo isolado Lp6, pertencente ao género *Pseudomonas*, da inibição de fitopatogénios da raiz e da degradação da celulose, por parte dos isolados Lp7a e Lp7b. Fica por saber, contudo, qual é especificamente o mecanismo e as moléculas que promovem tais atividades. Outros isolados, ao invés, mostraram ser patogénicos ao provocar necroses nas raízes, no caso de Lp5a, isolado identificado como *R. taibaishanense* e também ao desenvolverem tumores na raiz, como no caso do isolado Lp13b, que está filogeneticamente próximo das espécies de *R. rhizogenes* e *A. radiobacter*.

Os isolados estudados provenientes dos nódulos de *L. uliginosus* revelaram capacidade para nodular, de forma eficaz, *L. uliginosus* e *L. parviflorus* e, de forma ineficaz, *L. tenuis* e *L. corniculatus*. Obtiveram homologia de 100 % ou muito próximo entre si e com certas estirpes anteriormente isoladas dos nódulos de *L. uliginosus* em Portugal (Lorite *et al.*, 2012) e no Uruguai (Batista *et al.*, 2013), tanto para os genes 16S rRNA e *housekeeping* (*recA* e *glnII*), como para os genes simbióticos (*nodC* e *nifH*). Estes isolados estão filogeneticamente relacionados com estirpes de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) e *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*.

Futuramente seria interessante complementar a caracterização de microssimbiontes de leguminosas silvestres não exploradas, como *L. parviflorus*, reveladores de grande

diversidade e, simultaneamente, efetuar também outros estudos com as inoculações mistas, para se perceber melhor o modo como bactérias, não pertencentes à família *Rhizobiaceae*, entram no nódulo. Seria igualmente interessante, complementar também a caracterização das bactérias simbióticas nos nódulos de *L. uliginosus*, já que também se poderão encontrar espécies de outros géneros, para além de *Bradyrhizobium*, como por exemplo, *Mesorhizobium*. Por fim, seria importante identificar os compostos envolvidos nas atividades *PGPR* detetadas, para além da fixação de azoto, recorrendo, por exemplo, à cromatografia gasosa e líquida, acopladas à espectrometria de massa.

7. Bibliografia

- Ahnia, H., Boulila, F., Boulila, A., Boucheffa, K., Durán, D., Bourebaba, Y., & Rey, L. (2014). *Cytisus villosus* from Northeastern Algeria is nodulated by genetically diverse *Bradyrhizobium* strains. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105(6), 1121–9.
- Allan, G. J., Francisco-Ortega, J., Santos-Guerra, A., Boerner, E., & Zimmer, E. A. (2004). Molecular phylogenetic evidence for the geographic origin and classification of Canary Island *Lotus* (Fabaceae: Loteae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32(1), 123–38.
- Alves, A., Correia, A., Luque, J., & Phillips, A. (2004). *Botryosphaeria corticola*, sp. nov. on *Quercus* species, with notes and description of *Botryosphaeria stevensii* and its anamorph, *Diplodia mutila*. *Mycologia*, 96(3), 598–613.
- Andreani, N. A., Martino, M. E., Fasolato, L., Carraro, L., Montemurro, F., Mioni, R., & Cardazzo, B. (2014). Tracking the blue: a MLST approach to characterise the *Pseudomonas fluorescens* group. *Food Microbiology*, 39, 116–26.
- Appleby, C. A. (1984). Leghemoglobin and *Rhizobium* Respiration. *Annual Review of Plant Physiology*, 35(1), 443–78.
- Atkinson, E. M., Palcic, M. M., Hindsgaul, O., & Long, S. R. (1994). Biosynthesis of *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide Nod factors: NodA is required for an N-acyltransferase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(18), 8418–22.
- Batista, L., Tomasco, I., Lorite, M. J., Sanjuán, J., & Monza, J. (2013). Diversity and phylogeny of rhizobial strains isolated from *Lotus uliginosus* grown in Uruguayan soils. *Applied Soil Ecology*, 66, 19–28.
- Bazhanov, D. P., & Yatsевич, K. K. (2011). Taxonomic heterogeneity of the collection strains of fluorescent pseudomonads. *Microbiology*, 80(1), 89–95.
- Beringer, J. E. (1974). R Factor Transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology*, 84(1), 188–98.
- Blumenthal, M. J., & McGraw, R. L. (1999). *Lotus* adaption, use, and management. In: Beuselinck, P. R., (ed.). *Trefoil: the science and technology of Lotus*. CSSA Spec. Publ. 28. Madison, WI: CSSA; p. 97–119.
- Brasier, C. (1996). *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change. *Annales Des Sciences Forestières*, 53(2-3), 347–358.

- Cámara, B., Strömpl, C., Verbarg, S., Spröer, C., Pieper, D. H., & Tindall, B. J. (2007). *Pseudomonas reinekei* sp. nov., *Pseudomonas moorei* sp. nov. and *Pseudomonas mohnii* sp. nov., novel species capable of degrading chlorosalicylates or isopimaric acid. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(Pt 5), 923–31.
- Chahboune, R., Carro, L., Peix, A., Barrijal, S., Velázquez, E., & Bedmar, E. J. (2011). *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(Pt 12), 2922–7.
- Chen, L., Figueredo, A., Villani, H., Michajluk, J., & Hungria, M. (2002). Diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from field-grown soybean nodules in Paraguay. *Biology and Fertility of Soils*, 35(6), 448–57.
- Christensen, P., & Cook, F. D. (1978). *Lysobacter*, a New Genus of Nonfruiting, Gliding Bacteria with a High Base Ratio. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 28(3), 367–93.
- Cooper, J. E., Wood, M., & Bjourson, A. J. (1985). Nodulation of *Lotus pedunculatus* in acid rooting solution by fast- and slow-growing rhizobia. *Soil Biology and Biochemistry*, 17(4), 487–492.
- Crozat, Y., Cleyet-Marel, J. C., Giraud, J. J., & Obaton, M. (1982). Survival rates of *Rhizobium japonicum* populations introduced into different soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 14(4), 401–5.
- Crutzen, P. J., Mosier, A. R., Smith, K. A., & Winiwarter, W. (2008). N₂O release from agro-biofuel production negates global warming reduction by replacing fossil fuels. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 8(2), 389–395.
- Cunningham, J. E., & Kuiack, C. (1992). Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(5), 1451–8.
- D’Haeze, W., & Holsters, M. (2002). Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology*, 12(6), 79R–105R.
- De Bruijn, F. J. (1992). Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(7), 2180–7.
- De Lajudie, P., Willems, A., Nick, G., Mohamed, S. H., Torck, U., Coopman, R., Filali-Maltouf, A., Kersters, K., Dreyfus, B., Lindström, K., & Gillis, M. (1999). *Agrobacterium* bv. 1 Strains Isolated from Nodules of Tropical Legumes. *Systematic and Applied Microbiology*, 22(1), 119–132.

- De Meyer, S. E., Van Hoorde, K., Vekeman, B., Braeckman, T., & Willems, A. (2011). Genetic diversity of rhizobia associated with indigenous legumes in different regions of Flanders (Belgium). *Soil Biology and Biochemistry*, 43(12), 2384–96.
- Denison, R. F., & Kiers, E. T. (2004). Lifestyle alternatives for rhizobia: mutualism, parasitism, and forgoing symbiosis. *FEMS Microbiology Letters*, 237(2), 187–93.
- Drewniak, L., Styczek, A., Majder-Lopatka, M., & Sklodowska, A. (2008). Bacteria, hypertolerant to arsenic in the rocks of an ancient gold mine, and their potential role in dissemination of arsenic pollution. *Environmental Pollution*, 156(3), 1069–74.
- Estrella, M. J., Muñoz, S., Soto, M. J., Ruiz, O., & Sanjuán, J. (2009). Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado River Basin (Argentina). *Applied and Environmental Microbiology*, 75(4), 1088–98.
- Ezawa, T., Cavagnaro, T. R., Smith, S. E., Smith, F. A., & Ohtomo, R. (2004). Rapid accumulation of polyphosphate in extraradical hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus as revealed by histochemistry and a polyphosphate kinase/luciferase system. *New Phytologist*, 161(2), 387–92.
- Ferguson, B. J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M. H., Lin, Y. H., Reid, D. E., & Gresshoff, P. M. (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(1), 61–76.
- Ferreira, E. M., & Marques, J. F. (1992). Selection of Portuguese *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii strains for production of legume inoculants. *Plant and Soil*, 147(1), 151–58.
- Frank, B. (1889). Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 7(8), 332–46.
- Franza, T., Mahé, B., & Expert, D. (2005). *Erwinia chrysanthemi* requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection. *Molecular Microbiology*, 55(1), 261–75.
- Friesen, M. L., & Mathias, A. (2010). Mixed infections may promote diversification of mutualistic symbionts: why are there ineffective rhizobia? *Journal of Evolutionary Biology*, 23(2), 323–34.
- Fulchieri, M. M., Estrella, M. J., & Iglesias, A. A. (2001). Characterization of *Rhizobium loti* strains from the Salado River Basin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 79(2), 119–25.

- Gaunt, M. W., Turner, S. L., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, S. A., & Young, J. P. (2001). Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(Pt 6), 2037–48.
- Glick, B. R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41(2), 109–117.
- Göttfert, M., Röthlisberger, S., Kündig, C., Beck, C., Marty, R., & Hennecke, H. (2001). Potential symbiosis-specific genes uncovered by sequencing a 410-kilobase DNA region of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. *Journal of Bacteriology*, 183(4), 1405–12.
- Graham, P. H., & Vance, C. P. (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, 131(3), 872–7.
- Gray, E. J., & Smith, D. L. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(3), 395–412.
- Haber, F. (1910). Über die Darstellung des Ammoniaks aus Stickstoff und Wasserstoff. *Zeitschrift Für Elektrochemie Und Angewandte Physikalische Chemie*, 16(7), 244–46.
- Hardham, A. R. (2005). *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Plant Pathology*, 6(6), 589–604.
- He, Z. L., Bian, W., & Zhu, J. (2007). Screening and identification of microorganisms capable of utilizing phosphate adsorbed by goethite. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 33(5-6), 647–663.
- Herrera-Cervera, J. A., Caballero Mellado, J., Laguerre, G., Tichy, H. V., Requena, N., Amarger, N., Martínez-Romero, E., Olivares J., & Sanjuan, J. (1999). At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 30(1), 87–97.
- Hirsch, A. M. (1992). Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist*, 122(2), 211–37.
- Hryniewicz, K., Baum, C., & Leinweber, P. (2010). Density, metabolic activity, and identity of cultivable rhizosphere bacteria on *Salix viminalis* in disturbed arable and landfill soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 173(5), 747–56.
- Hunt, S., & Layzell, D. B. (1993). Gas Exchange of Legume Nodules and the Regulation of Nitrogenase Activity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 44(1), 483–511.
- Illmer, P., Barbato, A., & Schinner, F. (1995). Solubilization of hardly-soluble AlPO_4 with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(3), 265–70.

- Jarvis, B. D. W., Pankhurst, C. E., & Patel, J. J. (1982). *Rhizobium loti*, a New Species of Legume Root Nodule Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 32(3), 378–380.
- Jensen, H. L. (1941). Nitrogen fixation in leguminous plants. I. General characters of root-nodule bacteria isolated from species of *Medicago* and *Trifolium* in Australia. *Proceedings of The Linnean Society of New South Wales*, 67, 98–108.
- Jensen, H. L. (1967). Mutual host plant relationships in two groups of legume root nodule bacteria (*Rhizobium* spp.). *Archiv Für Mikrobiologie*, 59(1-3), 174–9.
- Kamboj, D., Kumar, R., Kumari, A., Kundu, B. S., Pathak, D., & Sharma, P. K. (2008). Rhizobia, nod factors and nodulation – A review. *Agricultural Reviews*, 29(3), 200–6.
- Kim, M., Oh, H. S., Park, S. C., & Chun, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt 2), 346–51.
- Kloepper, J. W., Lifshitz, R., & Zablotowicz, R. M. (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology*, 7(2), 39–44.
- Kumar, B. R., (2012). DNA Representation. In: Munshi, A. (ed.), *DNA Sequencing – Methods and Applications*. InTech. Rijeka, Croácia. pp. 3-14.
- Kumar, G. K., & Ram, M. R. (2014). Phosphate Solubilizing Rhizobia Isolated from *Vigna trilobata*. *American Journal of Microbiological Research*, 2(3), 105–9.
- Kwon, S. W., Park, J. Y., Kim, J. S., Kang, J. W., Cho, Y. H., Lim, C. K., Kang, J. W., Cho, Y. H., Lim, C. K., Parker, M. A., & Lee, G. B. (2005). Phylogenetic analysis of the genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* on the basis of 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(Pt 1), 263–70.
- Lafay, B., & Burdon, J. J. (2006). Molecular diversity of rhizobia nodulating the invasive legume *Cytisus scoparius* in Australia. *Journal of Applied Microbiology*, 100(6), 1228–38.
- Laguerre, G., Nour, S. M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P., & Amarger, N. (2001). Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology (Reading, England)*, 147(Pt 4), 981–93.
- Lemanceau, P., & Alabouvette, C. (1993). Suppression of fusarium wilts by fluorescent pseudomonads: Mechanisms and applications. *Biocontrol Science and Technology*, 3(3), 219–234.

- Long, S. R. (1984). Genetics of *Rhizobium* nodulation. In: Kosupe, T., & Nester, E. W., (eds.), *Plant Microbe Interactions: Molecular and Genetic Perspectives*. pp. 265-306.
- Long, S. R. (1989). *Rhizobium*-legume nodulation: life together in the underground. *Cell*, 56(2), 203–14.
- Long, S. R. (1996). *Rhizobium* symbiosis: nod factors in perspective. *The Plant Cell*, 8(10), 1885–98.
- Lorite, M. J., Donate-Correa, J., del Arco-Aguilar, M., Pérez Galdona, R., Sanjuán, J., & León-Barrios, M. (2010a). *Lotus* endemic to the Canary Islands are nodulated by diverse and novel rhizobial species and symbiotypes. *Systematic and Applied Microbiology*, 33(5), 282–90.
- Lorite, M. J., Muñoz, S., Olivares, J., Soto, M. J., & Sanjuán, J. (2010b). Characterization of strains unlike *Mesorhizobium loti* that nodulate *Lotus* spp. in saline soils of Granada, Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(12), 4019–26.
- Lorite, M. J., Videira e Castro, I., Muñoz, S., & Sanjuán, J. (2012). Phylogenetic relationship of *Lotus uliginosus* symbionts with bradyrhizobia nodulating genistoid legumes. *FEMS Microbiology Ecology*, 79(2), 454–64.
- MacLean, A. M., Finan, T. M., & Sadowsky, M. J. (2007). Genomes of the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of legumes. *Plant Physiology*, 144(2), 615–22.
- Marinus, M. G. (1976). Adenine methylation of Okazaki fragments in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 128(3), 853–4.
- Markmann, K., & Parniske, M. (2009). Evolution of root endosymbiosis with bacteria: How novel are nodules? *Trends in Plant Science*, 14(2), 77–86.
- Márquez, A., & Stougaard, J. (2005). *Lotus Japonicus*, a general introduction. In: Márquez, A. (eds.), *Lotus Japonicus Handbook*, Springer. Sevilha, Espanha. pp. 3-15.
- Mateos, P. F., Jimenez-Zurdo, J. I., Chen, J., Squartini, A. S., Haack, S. K., Martinez-Molina, E., Hubbell, D. H., & Dazzo, F. B. (1992). Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(6), 1816–22.
- Menna, P., & Hungria, M. (2011). Phylogeny of nodulation and nitrogen-fixation genes in *Bradyrhizobium*: supporting evidence for the theory of monophyletic origin, and spread and maintenance by both horizontal and vertical transfer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(Pt 12), 3052–67.

- Mousavi, S. A., Österman, J., Wahlberg, N., Nesme, X., Lavire, C., Vial, L., Paulin, L., de Lajudie, P., & Lindström, K. (2014). Phylogeny of the *Rhizobium-Allorhizobium-Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 37(3), 208–15.
- Muresu, R., Polone, E., Sulas, L., Baldan, B., Tondello, A., Delogu, G., Cappuccinelli, P., Alberghini, S., Benhizia, Y., Benhizia, H., Benguedouar, A., Mori, B., Calamassi, R., Dazzo, F. B., & Squartini, A. (2008). Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. *FEMS Microbiology Ecology*, 63(3), 383–400.
- Newton, W. E. (2007). Physiology, biochemistry and molecular biology of nitrogen fixation. In: Bothe, H., Ferguson, S. J., Newton W. E. (eds.). *Biology of the nitrogen cycle*. Elsevier, Amsterdam, pp. 109–130.
- Okon, Y., & Kapulnik, Y. (1986). Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. *Plant and Soil*, 90(1-3), 3–16.
- Pandya, M., Kumar, G. N., & Rajkumar, S. (2013). Invasion of rhizobial infection thread by non-rhizobia for colonization of *Vigna radiata* root nodules. *FEMS Microbiology Letters*, 348(1), 58–65.
- Pedraza, R. O., Ramírez-Mata, A., Xiqui, M. L., & Baca, B. E. (2004). Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic acid production by associative nitrogen-fixing bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 233(1), 15–21.
- Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio-Rivera, L. S., & Fernández, F. J. (2007). O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of Microbiological Methods*, 70(1), 127–31.
- Philipson, M. N., & Blair, I. D. (1957). Bacteria In Clover Root Tissue. *Canadian Journal of Microbiology*, 3(2), 125–9.
- Postma, J., Nijhuis, E. H., & Yassin, A. F. (2010). Genotypic and phenotypic variation among *Lysobacter capsici* strains isolated from *Rhizoctonia* suppressive soils. *Systematic and Applied Microbiology*, 33(4), 232–5.
- Pueppke, S. G., & Broughton, W. J. (1999). *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 12(4), 293–318.
- Puopolo, G., Sonego, P., Engelen, K., & Pertot, I. (2014). Draft Genome Sequence of *Lysobacter capsici* AZ78, a Bacterium Antagonistic to Plant-Pathogenic Oomycetes. *Genome Announcements*, 2(2), e00325-14.

- Randemaker, J. L. W., & de Bruijn, F. J. (1997). Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. *In: Caetano-Anollés, G., Gresshoff, P.M. (eds.), DNA Markers: Protocols, Applications and Overviews. Wiley-VCH. New York. pp.151-171.*
- Rejili, M., Lorite, M. J., Mahdhi, M., Pinilla, J. S., Ferchichi, A., & Mars, M. (2009). Genetic diversity of rhizobial populations recovered from three *Lotus* species cultivated in the infra-arid Tunisian soils. *Progress in Natural Science, 19*(9), 1079–87.
- Robledo, M., Jiménez-Zurdo, J. I., Velázquez, E., Trujillo, M. E., Zurdo-Piñeiro, J. L., Ramírez-Bahena, M. H., Ramos, B., Díaz-Mínguez, J. M., Dazzo, F., Martínez-Molina, E., & Mateos, P. F. (2008). *Rhizobium* cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105*(19), 7064–9.
- Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances, 17*(4-5), 319–39.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science, 239*(4839), 487–91.
- Sambrook, J., & Russel, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 74*(12), 5463–7.
- Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E., Kato, T., Nakao, M., Sasamoto, S., Watanabe, A., Ono, A., Kawashima, K., Fujishiro, T., Katoh, M., Kohara, M., Kishida, Y., Minami, C., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimizu, Y., Shinpo, S., Takahashi, C., Wada, T., Yamada, M., Ohmido, N., Hayashi, M., Fukui, K., Baba, T., Nakamichi, T., Mori, H., & Tabata, S. (2008). Genome structure of the legume, *Lotus japonicus*. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes, 15*(4), 227–39.
- Sayyed, R. Z., Badgujar, M. D., Sonawane, H. M., Mhaske, M. M., & Chincholkar, S. B. (2005). Production of microbial iron chelators (siderophores) by fluorescent *Pseudomonads*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 4*(October), 484–90.
- Schultze, M., & Kondorosi, A. (1998). Regulation of symbiotic root nodule development. *Annual Review of Genetics, 32*, 33–57.

- Somasegaran, P., & Hoben, H. J., (1994). Handbook for Rhizobia: Methods in Legume- *Rhizobium* Technology. Springer-Verlag, Berlin.
- Spaink, H. P. (2000). Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 54, 257–88.
- Sridevi, M., Kumar, K. G., & Mallaiah, K. V. (2008). Production of Catechol-type of Siderophores by *Rhizobium* sp. Isolated from Stem Nodules of *Sesbania procumbens* (Roxb.) W and A. *Research Journal of Microbiology*, 3(4), 282–287.
- Stepkowski, T., Moulin, L., Krzyżńska, A., McInnes, A., Law, I. J., & Howieson, J. (2005). European origin of *Bradyrhizobium* populations infecting lupins and serradella in soils of Western Australia and South Africa. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 7041–52.
- Stepkowski, T., Zak, M., Moulin, L., Króliczak, J., Golińska, B., Narożna, D., Safronova, V. I., Mądrzak, C. J., & Mądrzak, C. J. (2011). *Bradyrhizobium canariense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the two dominant rhizobium species in root nodules of lupin and serradella plants growing in Europe. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(5), 368–75.
- Sullivan, J. T., Eardly, B. D., van Berkum, P., & Ronson, C. W. (1996). Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(8), 2818–25.
- Sylvester-Bradley, R., Kipe-Nolt, J. A., Valencia, C. A., & Medina, L. M., (1988). The Legume-*Rhizobium* Symbiosis: Evaluation, Selection and Agronomic Management. Ciat.Cali, Columbia.
- Udvardi, M. K., & Day, D. A. (1997). Metabolite Transport Across Symbiotic Membranes Of Legume Nodules. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, 493–523.
- Van Pelt-Verkuil, E., van Belkum, A., & Hays, J. P. (2008). *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. Dordrecht: Springer, Netherlands.
- Velázquez, E., Peix, A., Zurdo-Piñeiro, J. L., Palomo, J. L., Mateos, P. F., Rivas, R., Muñoz-Adelantado, E., Toro, N., García-Benavides, P., & Martínez-Molina, E. (2005). The coexistence of symbiosis and pathogenicity-determining genes in *Rhizobium rhizogenes* strains enables them to induce nodules and tumors or hairy roots in plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 18(12), 1325–32.
- Verma, S. C., Ladha, J. K., & Tripathi, A. K. (2001). Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Journal of Biotechnology*, 91(2-3), 127–41.

- Versalovic, J., Koeuth, T., & Lupski, J. R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19(24), 6823–31.
- Vikman, P., & Vessey, J. K. (1993). Ontogenetic Changes in Root Nodule Subpopulations of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Experimental Botany*, 44(3), 579–586.
- Vincent, J. M., (1970). A Manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP Handbook no. 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Vinuesa, P., Silva, C., Werner, D., & Martínez-Romero, E. (2005). Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34(1), 29–54.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703.
- Weller, D. M., & Thomashao, L. S. (1994) Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere. In: O'Gara, F., Dowling, D. N., Boesten, B. (eds.) *Molecular ecology of rhizosphere microorganisms: Biotechnology and the release of GMOs*. Vch, Weinheim. pp. 1–18.
- Wu, L. J., Wang, H. Q., Wang, E. T., Chen, W. X., & Tian, C. F. (2011). Genetic diversity of nodulating and non-nodulating rhizobia associated with wild soybean (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) in different ecoregions of China. *FEMS Microbiology Ecology*, 76(3), 439–50.
- Xie, F., Murray, J. D., Kim, J., Heckmann, A. B., Edwards, A., Oldroyd, G. E. D., & Downie, J. A. (2012). Legume pectate lyase required for root infection by rhizobia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(2), 633–8.
- Yao, L. J., Shen, Y. Y., Zhan, J. P., Xu, W., Cui, G. L., & Wei, G. H. (2012). *Rhizobium taibaishanense* sp. nov., isolated from a root nodule of *Kummerowia striata*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(Pt 2), 335–41.
- Yarrow, D. (1998). Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: Kurtzman, C. P., & Fell, J. W. (ed.), *The yeasts, a taxonomic study*, 4th ed. Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands. pp. 77-100.

8. Anexos

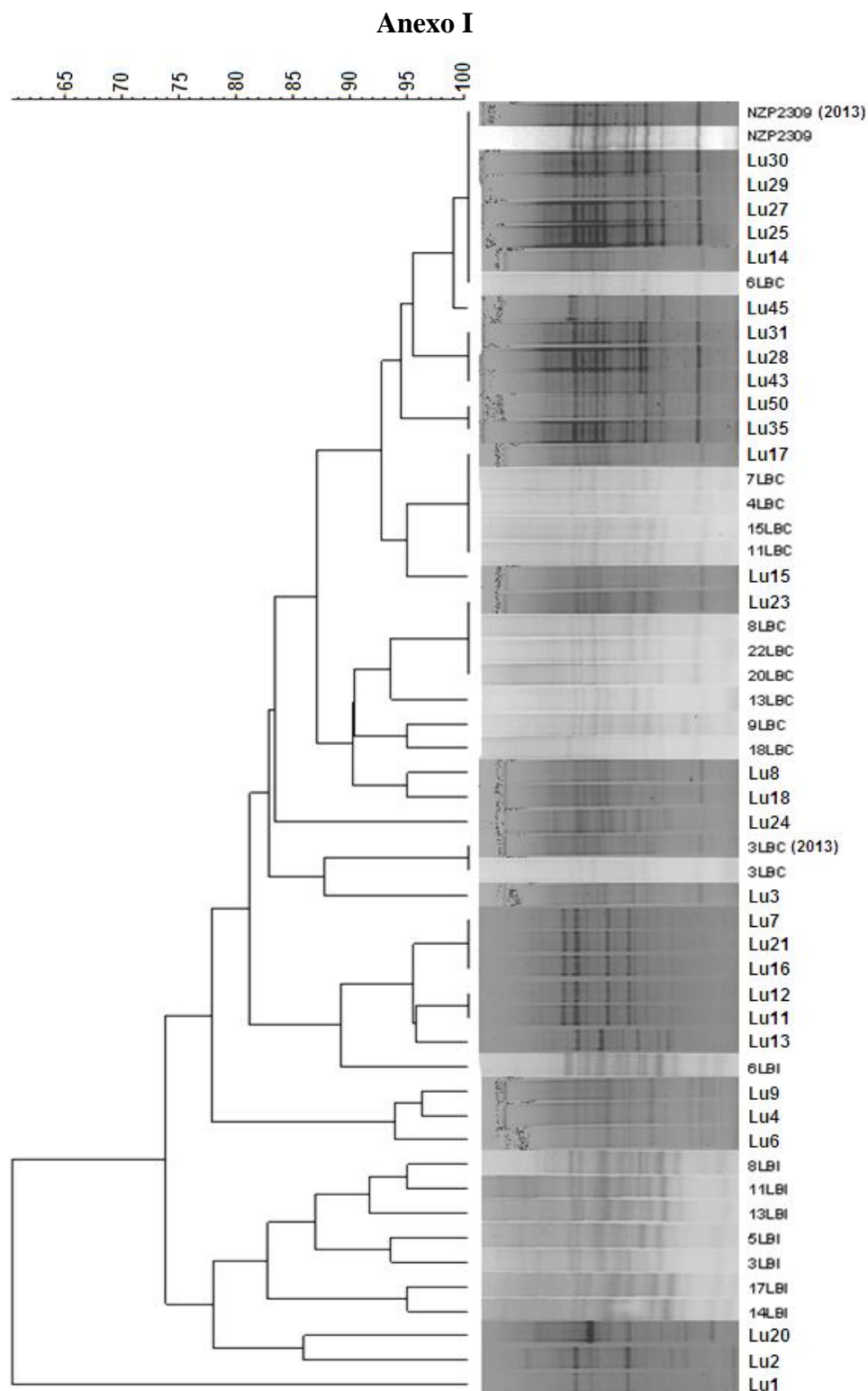


Figura 38: Géis de eletroforese resultantes da amplificação por REP-PCR das estirpes de *L. uliginosus* isoladas neste estudo e das estirpes descritas em Lorite *et al.* (2012)., e respetivo dendograma efetuado segundo o programa *Infoquest* da *Bio-Rad*. Foram pré-selecionados os isolados do presente estudo que não possuísssem mais de 95 % de semelhança com os restantes.

Anexo II

Kit Real[®] da Real Genomics

Para a utilização do “*kit Real*” da *Real Genomics* procedeu-se do seguinte modo:

A partir de 1 ml de cultura líquida em fase logarítmica, centrifugou-se durante 30 seg a 14000 g e retirou-se o sobrenadante. Adicionou-se 600 µl de solução de lise ao “*pellet*”, para ressuspender e lisar. Incubou-se a 80 °C, durante 5 min. De seguida, adicionou-se 300 µl de solução de precipitação de proteínas e agitou-se num vórtex durante 30 seg. Centrifugou-se a 14000 g durante 5 min. Em seguida, passou-se o sobrenadante para um microtubo de 1.5 ml com 600 µl de isopropanol, misturou-se por inversão, centrifugou-se durante 3 min a 14000 g e eliminou-se o sobrenadante. Adicionou-se 600 µl de etanol (a 70 %), centrifugou-se a 14000 g durante 2 min, eliminou-se o etanol e inverteu-se o tubo para volatilizar o restante. Para hidratar o DNA adicionou-se 200 µl de solução de hidratação de DNA, incubou-se a 65 °C durante 1 h com agitações intercalares.

Kit Nucleospin tissue DNA extraction

Quando se utilizou o “*kit Nucleospin tissue DNA extraction*” da *Macherey-Nagel*, foram efetuados os seguintes passos:

A partir de 1-1,5 ml de cultura líquida, em fase logarítmica, e em meio TY, centrifugou-se a 8000 r.p.m. e descartou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o *pellet* em 180 µl de tampão de lise (T1) e em 25 µl de Proteinase k (20 mg/ml), homogeneizou-se a mistura e incubou-se a 56 °C durante 2 - 3 h. Após a incubação, adicionou-se 200 µl de tampão de lise (B3), homogeneizou-se no vórtex e incubou-se a mistura a 70 °C durante 10 min. Após a lise celular, adicionou-se 210 µl de etanol e agitou-se de imediato no vórtex. Colocou-se a amostra numa coluna de purificação fornecida pelo kit, centrifugou-se durante 1 min a 11000 r.p.m e eliminou-se o eluído. Repetiu-se novamente este passo. Em seguida, lavou-se a membrana da coluna, adicionando 500 µl de tampão B5, centrifugou-se a 14000 r.p.m. durante 1 min e eliminou-se o eluído. Voltou-se a repetir este passo. Centrifugou-se apenas a coluna a 14000 r.p.m. durante 3 min e transferiu-se esta para um novo microtubo. Adicionou-se 100 µl de tampão de eluição (BE ou TE) e incubou-se a 70 °C durante 2 min. Ao fim deste tempo esperou-se 1 min à temperatura ambiente e

centrifugou-se durante 1 min a 14000 r.p.m.. As colunas foram descartadas e o microtubo com o DNA extraído foi guardado a 4 °C.

Kit Aqua Pure Genomic DNA

Quando se utilizou o “*kit Aqua Pure Genomic DNA*” da *Bio-Rad*, efetuaram-se os seguintes passos:

A partir de 1,5 ml de cultura líquida em fase logarítmica, centrifugou-se a 12000 r.p.m. durante 3 min. Ressuspende-se o *pellet* em 300 µl de Solução de lise, em seguida incubou-se a 80°C durante 5 min e adicionou-se 1,5 µl de solução de RNase, invertendo-se 50 x os tubos e incubou-se a 37° durante 45 min. As amostras, foram depois arrefecidas durante 2 min à temperatura ambiente, tendo-se de seguida adicionado 100 µl de solução de precipitação de proteínas. Agitou-se vigorosamente durante 20 seg e centrifugou-se a 13000 r.p.m. durante 3 min. O sobrenadante foi transferido cuidadosamente para um novo tubo contendo 300 µl de isopropanol e homogeneizado, invertendo-se os tubos 25 x. Centrifugou-se a 13000 r.p.m. durante 1 min e descartou-se o sobrenadante cuidadosamente. Em seguida adicionou-se 300 µl de etanol a 70 %, inverteram-se os tubos 10 x e centrifugou-se a 13000 r.p.m. durante 1 min. Descartou-se cuidadosamente o sobrenadante e deixou-se o tubo invertido ao ar para evaporar o restante etanol contido, durante cerca de 20 min ou até que o DNA estivesse completamente seco e sem conter restos de etanol. Adicionou-se 100 µl de solução de hidratação ou TE e incubou-se a 65 °C durante 45 min (ou até estar eluído) com agitações intercalares. Os microtubos contendo o DNA extraído foram em seguida guardados a 4 °C.

Anexo III

De acordo com o kit *Qiagen (QIAEXII 2008, DNA fragments extraction from Agarose Gels)*, procedeu-se do seguinte modo:

Com recurso a um transiluminador, corta-se a porção do gel de agarose contendo a banda com o DNA a extrair com recurso a uma lâmina limpa, e coloca-se este fragmento num microtubo sem cor. Adiciona-se 3 vezes o volume de tampão QIEXI para o peso da porção do gel de agarose cortada (para fragmentos de 100 pb a 4 kb). Ressuspende-se o tampão QIEXII no vórtex durante 30 seg e em seguida adiciona-se 10 µl deste tampão (para quantidades inferiores a 2 µg de DNA). Incuba-se a 50 °C durante 10 min com agitações intercalares, solubilizando-se assim a agarose e ficando o tampão QIEXII sempre em suspensão. Certifica-se que a cor fica amarela (caso contrário, adiciona-se 10 µl de acetato de sódio a 3 M e pH - 5). Centrifuga-se durante 30 seg e remove-se o sobrenadante. Ressuspende-se o *pellet* em 500 µl de tampão QIEXI, centrifuga-se a 13.000 r.p.m. durante 30 seg e descarta-se o sobrenadante. Em seguida, ressuspende-se em 500 µl de tampão PE, centrifuga-se a 13.000 r.p.m. durante 30 seg e descarta-se o sobrenadante. Seca-se o *pellet* ao ar até ficar branco. Elui-se o DNA com 100 µl de H₂O Milli-Q, e incuba-se à temperatura ambiente durante 5 min. Finalmente, centrifuga-se durante 30 seg e transfere-se o sobrenadante para um novo tubo, e guarda-se a 4 °C.

Anexo IV

Tabela 12: Média do peso seco da parte aérea das várias plantas hospedeiras *Lotus* inoculadas com os isolados de *L. parviflorus* e de *L. uliginosus*, e com os respectivos controlos.

		Média do peso seco da parte aérea (mg)				
		<i>L. parviflorus</i>	<i>L. uliginosus</i>	<i>L. tenuis</i> cv. Esmeralda	<i>L. tenuis</i> cv. Pampa INTA	<i>L. corniculatus</i>
Isolados de <i>L. parviflorus</i>	Lp5a	1,8	4,3	2,1	2,8	2,3
	Lp5b	4,7	2,3	3,6	1,5	2,1
	Lp6	2,8	2,8	2,1	2,7	2,0
	Lp7a	7,1	4,4	3,8	4,0	3,4
	Lp7b	9,2	5,8	2,7	4,8	2,2
	Lp8	1,6	2,1	2,5	1,8	2,3
	Lp9	3,2	2,3	3,3	2,7	3,8
	Lp10	6,8	4,0	3,1	2,3	1,3
	Lp11	9,8	7,0	3,2	3,2	2,0
	Lp12	2,9	2,7	1,7	3,1	2,5
	Lp13a	2,0	2,1	1,2	1,9	2,8
	Lp13b	1,5	2,0	2,2	1,8	2,1
	Lp14	3,8	2,0	2,5	3,1	2,1
Isolados de <i>L. uliginosus</i>	Lu1	3,5	20,2	2,1	2,0	1,6
	Lu2	1,8	21,2	1,7	3,5	2,1
	Lu4	5,4	16,2	2,4	3,0	3,7
	Lu8	4,9	23,9	1,8	2,7	2,3
	Lu13	2,0	2,6	2,4	2,6	1,2
	Lu16	6,2	15,0	1,9	2,8	2,6
	Lu17	6,0	21,5	2,6	2,6	1,6
	Lu20	3,7	17,8	3,8	2,8	2,6
	Lu35	4,2	20,9	3,3	3,3	1,3
	T0	2,2	3,1	2,6	2,3	3,1
	TN	16,0	39,9	27,8	37,3	32,2

